

녹차추출물 및 죽염처리에 의한 된장의 항돌연변이 및 *in vitro* 항암활성 증진효과

황경미¹ · 오성훈² · 박건영^{3*}

¹경인지방식품의약품안전청 유해물질분석반

²안산공과대학 식품생명과학과

³부산대학교 식품영양학과

Increased Antimutagenic and *in vitro* Anticancer Effects by Adding Green Tea Extract and Bamboo Salt during Doenjang Fermentation

Kyung-Mi Hwang¹, Sung-Hoon Oh² and Kun-Young Park^{3*}

¹Hazard Substances Analysis Team, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, Incheon 402-835, Korea

²Dept. of Food Science and Biotechnology, Ansan College of Technology, Gyeonggi 425-792, Korea

³Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

Antimutagenic and *in vitro* anticancer effects of doenjangs added with green tea extract and/or using bamboo salt were studied by Ames test using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) TA100 and 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay on PC-3 and DU145 human prostate cancer cells, respectively. At the 1.25 mg/plate concentration, 1% green tea extract (GTE) added doenjang exhibited 85% antimutagenicity against aflatoxin B₁ (AFB₁), while the control doenjang revealed 63% antimutagenicity, showing increased antimutagenic effect by the addition of green tea extract during doenjang fermentation. GTE added doenjang also increased antimutagenic effect against MNNG. The inhibition rate of the control doenjang showed 34% at 0.625 mg/plate, while 1% and 2% GTE added doenjangs inhibited by 56% and 73% at the 0.625 and 1.25 mg/plate, respectively ($p < 0.05$). In MTT assay, GTE added doenjangs caused 70%~77% inhibition on the proliferation of PC-3 human prostate cancer cells at 0.5 mg/mL while the control doenjang exhibited 46% inhibition. However, 2% GTE added doenjang showed 91% inhibition at 1.0 mg/mL. The trend of the inhibition rate was similar in DU145 human prostate adenocarcinoma cells. When bamboo salt was used instead of natural sea salt, the antimutagenicity against MNNG and *in vitro* anticancer effect on the prostate cancer cells greatly increased. From these results, it can be concluded that green tea extract addition to doenjang and the use of bamboo salt during doenjang preparation increased the antimutagenic and *in vitro* anticancer activities of the doenjang and showed a synergistic effect.

Key words: doenjang, antimutagenic, anticancer, green tea extract, bamboo salt

서 론

된장은 암예방 효과가 있다고 알려져 있고, 항산화효과, 혈관질환예방, 항비만 및 항균효과 등을 가지는 기능성이 높은 음식이다(1). 최근에는 전통된장의 가치를 높이고 된장의 기능성을 증대시키는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이 중 부재료를 된장에 첨가하는 방법을 사용함으로써 된장의 항암기능성을 증가시키려는 시도가 행해지고 있다. 특히 된장에 첨가하는 부재료로 주목받고 있는 것에는 버섯류, 미역, 매실, 마늘, 생강 등이 알려져 있다(2). 버섯 균사체를 이용하여 동충하초, 상황버섯, 영지버섯 된장 등이 제조되고

있고, 해조류를 첨가한 된장 중 미역첨가 된장은 일반된장보다 맛, 색, 향이 우수하다는 연구도 있었다(3). 이외에도 된장의 기능성을 높이기 위해 죽염 또는 한방 생약재를 첨가하여 만든 된장 등이 제조되고 있다. 죽염은 일반소금에 비해 여러 가지 무기질을 함유하고 있어(4) 여러 가지 질환에 예방 효과가 있다고 전해지며, 죽염을 사용한 발효식품의 항암효과가 보고되어지고 있다(5,6).

녹차는 커피, 홍차 및 코코아와 함께 카페인을 함유한 비알콜성 기호음료로서 이들에 비하여 질소, 폴리페놀, 당, 유기산, 비타민 및 무기질 등을 많이 함유하고 있는 것이 특징이다. 녹차 전체 가용성분의 절반이상을 차지하는 polyphenol

*Corresponding author. E-mail: kunypark@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2839, Fax: 82-51-514-3138

은 차의 색깔과 향기, 맛을 좌우하는 주요 성분으로 flavonols, flavandiols, flavonoid, phenolic acid를 포함한 polyphenol류를 함유하고 있어 강한 항산화력을 나타낸다. 이러한 물질들은 건조 중량의 약 30%를 차지하며 대부분의 녹차 polyphenol류는 catechin으로서 알려진 flavanol류이다. 몇 가지 중요한 녹차의 catechin은 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (ECGC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin 3-O-gallate(EGC), (-)-epicatechin(EC), (+)-gallocatechin (GC), (+)-catechin(C) 등이며(7), 녹차의 생리활성효과로는 항암효과, 항산화효과, 항비만효과 등이 알려져 있다(8-12).

된장과 녹차는 이러한 기능성 때문에 자체에서도 항암효과를 가지나, 된장 제조에 녹차를 첨가함으로써 생리적 활성이 더욱 높아지리라고 본다. 녹차된장은 일반 된장에 비해 된장 특유의 냄새가 적고, 녹차가 함유하고 있는 특수 아미노산 성분이 있어 녹차된장으로 된장을 끓이면 특별히 조미료를 첨가하지 않아도 맛이 담백한 것이 특징이며(13), 녹차된장의 이화학적 특성(14)이나 혈청 지질성분에 미치는 영향(13), 녹차를 첨가한 고추장의 항암증진효과(15)나 녹차첨가 청국장장의 관능적 품질에 관한 연구(16)는 있으나 항암활성이 증진된 녹차된장에 대한 연구는 거의 없다. 또한 된장 제조에 사용되는 소금의 종류가 암예방 기능성에 영향을 끼치므로(5) 암예방 증진 효과를 위해 죽염 사용 된장도 비교하였다. 특히 된장 및 대두에 있는 이소플라본은 유방암, 전립선암 등과 같이 호르몬과 관련된 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있으므로(1,17) 전립선암세포를 이용하여 *in vitro*에서 항암활성이 증진되는지를 검토하였다. 본 연구에서는 녹차추출물을 첨가하여 된장을 제조하고 또한 된장 제조시 죽염 처리효과를 비교하여 *in vitro*에서 Ames test를 이용하여 aflatoxin B₁(AFB₁)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 대한 항돌연변이 효과 및 인체 전립선암세포들에 대한 항암활성 증진효과를 살펴보았다.

재료 및 방법

된장 및 추출물의 제조

된장제조: 메주는 먼저 대두를 정선 및 수세하여 1.5배의 물(15°C)에 12시간 침지하고 물빼기를 하였다. 이를 비이커에 담아 고압멸균기(1.0~1.5 kg/cm³)에서 60분 동안 증자하여 50°C로 냉각하였다. 냉각한 콩에 코오지(*Asp. oryzae*, 총무발효, 울산)를 대두 무게의 0.2%를 접종하여 30°C incubator에서 36시간 발효시킨 후 55°C에서 열풍건조하여 콩알메주를 제조하였다. 이렇게 제조된 메주를 33, 소금 12, 물 55의 비율로 혼합하고 여기에 녹차추출물을 각각 1, 2% 첨가하여 30°C incubator에서 60일간 발효, 숙성시켰다. 항암활성 증진된장 제조의 첨가물로서 사용된 녹차추출분말(polyphenol 40% 이상 함유, 녹차염을 85% 주정을 이용하여 추출, 농축, 건조한 분말)은 (주)태평양으로부터 제공받아 실험에 사용하였고 소금은 천일염((주)우일염업)과 죽염((주)고려죽염, 1회 죽염)을 사용하였다.

추출물의 제조: 발효가 끝난 시료는 동결건조한 후 마쇄하여 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복한 후 여과하여 회전식 진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하여 메탄올추출물(methanol extract)을 얻었다. 이들 추출물들은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 희석하여 실험에 사용하였다.

Ames 돌연변이 유발 억제 실험

실험균주 및 돌연변이 유발물질: *Salmonella* Typhimurium LT-2의 histidine 영양요구성인 *Salmonella* Typhimurium TA100은 실험직접 histidine 요구성, deep rough (rfa) 돌연변이, *uvr*은 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다. 돌연변이 유발원으로 aflatoxin B₁ (AFB₁)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)을 이용하였는데, 간접 돌연변이원인 AFB₁은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였으며, dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여서 실험에 사용하였고, 직접돌연변이원인 MNNG는 Aldrich Chemical Co.(USA)로부터 구입하여 멸균 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

항돌연변이 효과실험: 항돌연변이 실험은 preincubation mutagenicity test를 이용하였다. 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 S9 mix 0.5 mL(간접돌연변이인 경우), 하룻밤 배양된 균주($1 \sim 2 \times 10^9$ cells/mL) 0.1 mL, 희석된 시료(50 μL)와 돌연변이 유발물질(50 μL)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex한 후 37°C에서 30분간 예비 배양하였다. 45°C의 top agar 2 mL씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다(18-20).

돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀돌연변이의 수이다.

인체 전립선암세포의 생존 저해효과

세포배양: 인체 전립선암세포(PC-3 및 DU145 human prostate carcinoma cells)는 한국세포주은행(서울의대)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. 각각의 세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 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 원심분리하였다. 집적된 암세포

에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대배양시 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

MTT assay: 배양된 암세포를 96 well plate에 well당 1×10^4 cells/mL가 되도록 seeding하고 시료를 농도별로 첨가한 다음, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 72시간 후 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 20 µL를 첨가하고 4시간 동안 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(21).

통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료(n=3)로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석하였다.

결과 및 고찰

녹차추출물 첨가 된장의 항돌연변이 효과

된장에 녹차추출물을 첨가했을 때 항돌연변이 활성에 미

치는 영향을 살펴보기 위하여 대조군 메주에 녹차추출물을 1% 또는 2%를 첨가하였다. 또한 천연염 대신 죽염을 사용하고 녹차를 1% 첨가한 메주로 나누어 각각 2달 발효시켰다. 그리고 시료의 메탄올추출물을 이용하여 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 살펴보았다(Table 1). 이때 녹차추출물 첨가 농도는 녹차카테킨을 이용한 연구(22)에서 10 mg/mouse 농도에서 효과를 보인다고 하여 본 실험에서도 하루 된장 섭취량을 환산하여 1% 및 2%로 첨가하였다. 돌연변이원 AFB₁에 대해 일반된장을 0.625 mg/plate의 농도로 처리했을 때 53%의 돌연변이 억제효과를 보인데 비해, 녹차를 1% 첨가한 된장의 억제 효과는 70%로 증가하였고(p<0.05), 2%를 첨가한 된장의 항돌연변이 효과는 72%였다. 시료처리 농도 1.25 mg/plate에서는 녹차를 첨가하지 않은 된장, 1% 및 2% 첨가 된장은 각각 63%, 85%, 87%의 항돌연변이 효과를 보여서 녹차 첨가에 의해 활성이 높아졌으나 1%나 2% 첨가에서 큰 차이가 없었다.

AFB₁에 대해서는 녹차 1%와 2% 첨가구의 활성과 녹차추출물을 1% 첨가하고 소금을 죽염으로 대체한 된장의 항돌연변이 효과도 유의적 차이가 나도록 크게 증가되지는 않아서 녹차 첨가는 1% 첨가된장에서 AFB₁에 대해 항돌연변이 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

Table 1. Effect of methanol extract from doenjangs added with green tea extract and/or using bamboo salt on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.6 µg/plate) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment (mg/plate)	Revertants/plate		
	0.625	1.25	2.5
Spontaneous	89 ± 14	89 ± 14	89 ± 14
AFB ₁ (Control)	1098 ± 112 ^{4d)}	1098 ± 112 ^a	1098 ± 112 ^a
NSS ¹⁾ + <i>doenjang</i>	566 ± 90 ^b (53) ⁵⁾	466 ± 97 ^b (63)	391 ± 74 ^b (70)
NSS + green tea extract ²⁾ (1%) added <i>doenjang</i>	389 ± 59 ^c (70)	245 ± 25 ^c (85)	204 ± 25 ^c (89)
NSS + green tea extract (2%) added <i>doenjang</i>	375 ± 10 ^c (72)	224 ± 11 ^c (87)	167 ± 21 ^c (92)
BS ³⁾ + green tea extract (1%) added <i>doenjang</i>	343 ± 9 ^c (75)	210 ± 17 ^c (88)	225 ± 21 ^c (87)

¹⁾NSS: natural sea salt.

²⁾Green tea extract: polyphenol 40%, Taepyeongyang Co.

³⁾BS: bamboo salt.

⁴⁾Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Inhibition rate (%) = [(N_{control} - N_{sample}) / (N_{control} - N_{spontaneous})] × 100.

Table 2. Effect of methanol extract from doenjangs added with green tea extract and/or using bamboo salt on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.4 µg/plate) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment (mg/plate)	Revertants/plate		
	0.625	1.25	2.5
Spontaneous	76 ± 19	76 ± 19	76 ± 19
MNNG (Control)	1034 ± 15 ^{4d)}	1034 ± 15 ^a	1034 ± 15 ^a
NSS ¹⁾ + <i>doenjang</i>	704 ± 54 ^b (34) ⁵⁾	531 ± 15 ^b (53)	307 ± 8 ^b (76)
NSS + green tea extract ²⁾ (1%) added <i>doenjang</i>	494 ± 32 ^c (56)	336 ± 4 ^c (73)	147 ± 6 ^c (93)
NSS + green tea extract (2%) added <i>doenjang</i>	550 ± 60 ^c (51)	354 ± 25 ^c (71)	98 ± 17 ^d (98)
BS ³⁾ + green tea extract (1%) added <i>doenjang</i>	311 ± 37 ^d (75)	229 ± 81 ^d (84)	144 ± 32 ^c (93)

¹⁾NSS: natural sea salt.

²⁾Green tea extract: polyphenol 40%, Taepyeongyang Co.

³⁾BS: bamboo salt.

⁴⁾Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Inhibition rate (%) = [(N_{control} - N_{sample}) / (N_{control} - N_{spontaneous})] × 100

Table 2는 녹차추출물의 첨가량과 소금을 달리하여 제조한 된장의 메탄올추출물을 이용하여 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 비교해 본 결과이다. 각각의 시료를 0.625 mg/plate 처리했을 때 대조군인 일반된장은 34%의 활성을 나타냈고, 1%와 2%의 녹차 첨가군은 각각 56%, 51%의 활성을 나타내었으며($p < 0.05$), 이러한 경향은 1.25 mg/plate 처리군에서도 마찬가지로 대조군이 53%의 돌연변이 억제효과를 보였고, 1% 및 2%의 첨가농도에서 각각 73%, 71%의 효과가 있었다. 한편 2.5 mg/plate의 시료처리 농도에서는 각각 93%, 98%의 높은 항돌연변이 효과를 보였다. MNNG를 이용한 실험에서도 녹차 1%와 2% 첨가 농도에서 저해효과의 큰 차이는 없었으나 죽염사용이 된장의 활성에 미치는 효과는 현저히 높아졌다($p < 0.05$). 0.625와 1.25 mg/plate 처리군에서는 녹차의 첨가비율이 2%로 증가되어도 천일염을 사용했을 때는 항돌연변이 활성이 높아지지 않았으나, 녹차를 1% 첨가하고 죽염을 사용한 시료군의 활성은 크게 높아졌다($p < 0.05$). 이렇게 된장의 제조에 죽염을 이용함으로써 항돌연변이 효과나 항암활성이 높아지는 것은 다른 연구에서 밝혀진 바 있는데(5) 천일염이나 한주소금을 사용하는 것보다 된장 제조시 죽염으로 대체하는 것이 된장의 생리활성을 더욱 높이는 방법이라 하겠다.

전통된장이 돌연변이원에 대한 억제효과를 보인다는 사실은 이미 알려져 있으며(1), 그 활성은 부재료의 첨가에 의해 더 증진될 수 있다. 그 중 된장의 주재료인 소금은 제조방법에 따라 종류가 다양한데, 죽염은 천일염을 왕대나무 마디 속에 다져 넣고 위를 물반죽한 황토로 막은 후 1,200도 이상의 높은 온도에서 구워 제조한다. 이 과정에서 천일염 속의 성분들이 대나무 속의 유황성분, 송진, 철 성분 등과 혼합되는 것으로 알려지고 있다. 죽염은 일반 소금과 달리 인체에 필요한 무기질을 풍부하게 함유하고 있으며, 특히 K, P, Fe, Ge 등이 많이 함유되어 있다(4). 뿐만 아니라 죽염은 예로부터 여러 가지 질환에 효과가 있다고 전해져 왔으며, 이와 관련하여 위염, 위궤양, 소화기 계통의 질환에 대한 효과와

외상치료, 해독작용에 대한 효과가 보고되어진 바 있다.

녹차는 음료로서 뿐만 아니라 생리활성이 매우 다양한데 아미노산인 theanine 등과 polyphenol류가 다량 함유되어 있으며, 지금까지 알려진 녹차 catechin의 생리활성으로는 혈중 콜레스테롤 저하(23)와 중금속류 제거작용(24), 충치 억제작용(25), 항암작용(26), 항돌연변이(27), 면역증강(28), 항산화작용(29) 및 혈소판 응집능 억제작용(30) 등이 있다고 알려지고 있다. 이러한 녹차의 생리활성효과 때문에 장류의 하나인 청국장에 녹차를 첨가한 제품이 시중에 판매되고 있으나 이는 청국장의 발효가 완료된 단계에서 단순히 녹차를 첨가한 제품으로 녹차를 첨가하여 발효시킨 제품은 아니다. 본 연구에서는 된장제조 단계에서 처음부터 녹차추출물을 첨가하여 된장과 함께 녹차의 발효도 진행되도록 하였다. 녹차의 발효에 대한 연구로는 Kim 등(16)의 연구에서 완전 발효차나 반발효차를 첨가한 청국장은 정상적인 발효가 진행되지 않았으나 불발효차 및 증체차 첨가구는 정상적 발효가 이루어졌다고 하였다. 그리고, 관능평가에서도 불발효차 및 증체차 첨가구는 일반된장에 비해 관능적 품질이 개선된 것으로 평가되었으므로 녹차의 첨가는 된장의 기능성 뿐만 아니라 관능적인 면에서도 소비자들이 선호할 수 있는 제품으로 개발될 수 있는 가능성을 제시하였다. 또 차의 발효정도에 따른 돌연변이 억제효과 비교연구(31)에서도 차 발효 중 생성되는 화합물에 의해 발효차에서 높은 항돌연변이 효과를 나타낸다고 했다. 이로써 된장에 녹차를 첨가하는 것은 발효미생물의 생육에는 영향을 주지 않으면서 발효가 진행됨에 따라 생성되는 산물에 의해 돌연변이 억제효과도 더 증진시킬 수 있다고 하겠다.

녹차추출물 첨가 된장의 *in vitro* 항암 효과

된장의 항암 기능성 증진을 위해 녹차추출물 및 죽염을 첨가한 된장의 PC-3 인체 전립선암세포에 대한 성장억제효과를 비교한 결과는 Table 3에 나타낸 바와 같다. 이 결과에서도 각 시료들은 Ames test에서와 같은 경향으로 녹차 첨가량의 증가에 비례하여 암세포 성장저해율도 농도의존적

Table 3. Growth inhibitory effect of methanol extract from doenjangs added with green tea extract and/or using bamboo salt against PC-3 human prostate adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Treatment (mg/mL)	OD ₅₄₀	
	0.5	1
Control	0.537 ± 0.008 ^{a4)}	0.537 ± 0.008 ^a
NSS ¹⁾ + doenjang	0.292 ± 0.017 ^b (46) ⁵⁾	0.200 ± 0.014 ^b (63)
NSS + green tea extract ²⁾ (1%) added doenjang	0.160 ± 0.006 ^c (70)	0.123 ± 0.010 ^c (77)
NSS + green tea extract (2%) added doenjang	0.126 ± 0.011 ^d (77)	0.051 ± 0.016 ^d (91)
BS ³⁾ + green tea extract (1%) added doenjang	0.098 ± 0.005 ^e (82)	0.030 ± 0.014 ^d (94)

¹⁾NSS: natural sea salt.

²⁾Green tea extract: polyphenol 40%, Taepyeongyang Co.

³⁾BS: bamboo salt.

⁴⁾Means with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Inhibition rate (%) = $\frac{OD_{540} \text{ of control} - OD_{540} \text{ of sample}}{OD_{540} \text{ of control}} \times 100$

Table 4. Growth inhibitory effect of methanol extract from doenjangs added with green tea extract and/or using bamboo salt against DU145 human prostate adenocarcinoma cells in 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Treatment (mg/mL)	OD ₅₄₀	
	0.5	1
Control	0.523±0.036 ^{ad)}	0.523±0.036 ^a
NSS ¹⁾ +doenjang	0.267±0.030 ^b (49) ⁵⁾	0.173±0.018 ^b (67)
NSS+green tea extract ²⁾ (1%) added doenjang	0.157±0.007 ^c (70)	0.130±0.006 ^c (75)
NSS+green tea extract (2%) added doenjang	0.118±0.009 ^d (77)	0.042±0.017 ^d (92)
BS ³⁾ +green tea extract (1%) added doenjang	0.098±0.005 ^d (81)	0.024±0.007 ^d (95)

¹⁾NSS: natural sea salt.

²⁾Green tea extract: polyphenol 40%, Taepyeongyang Co.

³⁾BS: bamboo salt.

⁴⁾Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Inhibition rate (%) = $\frac{OD_{540} \text{ of control} - OD_{540} \text{ of sample}}{OD_{540} \text{ of control}} \times 100$

으로 높아졌다. 각각의 메탄올추출물 시료를 0.5 mg/mL 처리했을 때 대조군인 일반된장이 46%의 항암활성을 나타내는데 비하여 녹차추출물을 1% 첨가한 시료는 70%, 2% 첨가한 시료는 77%의 PC-3 인체 전립선암세포 생존저해효과를 나타내어 첨가농도가 증가할수록 암세포의 생존을 더 억제함을 알 수 있었다. 1 mg/mL 처리농도에서는 첨가농도에 따라 항암활성이 더욱 증가되어 녹차추출물 1%를 첨가한 시료에서는 77%, 2%를 첨가한 시료에서는 91%의 항암활성을 나타냈다(p<0.05). 이로부터 녹차를 첨가하여 된장을 담은 경우가 일반된장에 비해 암세포의 성장을 더 크게 억제함을 알 수 있었다. 또 녹차 1% 첨가군에 죽염을 사용했을 때의 활성은 낮은 시료처리농도에서 대조군된장보다 2배에 가까운 항암효과를 보였고, 높은 처리농도에서도 역시 대조군보다 현저히 높아져(p<0.05), 녹차와 죽염을 동시에 사용할 경우 된장 활성의 상승효과를 나타내었다.

또 다른 인체 전립선암세포인 DU145를 이용한 항암효과 실험(Table 4)에서도 녹차추출물의 첨가농도가 증가할수록 농도 비례적으로 활성이 높아졌다. 0.5 mg/mL에서 대조군의 항암효과가 49%에서 녹차를 각각 1%, 2% 첨가함에 따라 그 효과가 70%, 77%로 증진되었으며, 1 mg/mL의 농도에서는 일반된장이 67%의 항암효과를 보인데 비해, 각각 75%, 92%의 항암활성을 보였다. 죽염을 사용한 녹차추출물 1% 첨가된장의 항암효과는 녹차 2% 처리농도에서보다도 높은 활성을 보여 주었다. 1회 죽염의 사용은 녹차의 사용량을 반으로 줄이며 *in vitro* 항암활성을 증진시킬 수 있다고 하겠다.

녹차의 항암효과는 Oguni 등(32)이 암 발생과 녹차 음용과의 관계를 찾아 본 이후부터 많은 관심을 갖기 시작하였다. Han과 Xu(33)는 쥐에서 식도암을 유발시켜 차 침출액을 경구투여한 결과 암 발병률과 암 증식이 억제됨을 보고하였으며, Wang 등(34)은 쥐에게 benzo(a)pyrene(BP) 또는 N-nitrosodiethylamine(NDEA)에 의해 유발된 식도암에 대해 녹차 침출액의 암형성 억제효과를 보고하였고, Yamane 등(35)은 MNNG에 의해 유발된 쥐의 선암이 EGCG 수용액

에 의해 대조군의 2배 정도 억제되었음을 보고하였다. 또 녹차가루와 카테킨을 첨가한 고추장은 AGS 인체 위암세포에 대한 성장저해율을 증가시킨다고 했다(15). 이러한 연구들을 통해 녹차를 된장에 첨가함으로써 그 외 다양한 암예방 관련 기작에도 영향을 끼칠 것으로 생각되어진다. 죽염된장에 관한 연구로는 죽염을 이용해 제조한 된장추출물이 인체 위암세포와 결장암세포에 대해 항암효과를 나타내었으며, 마우스를 이용한 중앙전이억제실험에서도 죽염된장을 투여했을 경우 높은 전이억제효과가 보였다고 하여(5) 된장에서 죽염사용은 *in vitro*에서 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 항암활성을 증진시킬 수 있다. 결국 이 실험에서는 암예방 활성이 알려진 된장에 녹차 첨가 및 죽염을 사용하므로 그 활성을 크게 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 전립선암세포 성장에 있어 된장의 이소플라본 성분 외에 녹차추출물 및 죽염 사용이 항암활성을 증진시키므로 다른 관련 암세포 또는 분자수준에서의 항암 기작 등의 연구가 더 필요하다. 그리고 발효 기간을 증가시킨다든지, 콩 종류, 균주의 선택 등에 의해서도 활성은 더욱 영향을 받을 것으로 보아 이와 관련된 연구는 더 계속되어야 하리라고 사료된다.

요 약

된장제조 중 녹차추출물 첨가 및 죽염을 사용할 경우 돌연변이 억제작용 및 *in vitro* 항암 기능이 증진되는 것으로 나타났다. 돌연변이원 AFB₁에 대해 시료처리 농도 1.25 mg/plate에서는 녹차추출물을 첨가하지 않은 된장, 1% 및 2% 첨가 된장은 각각 63%, 85%, 87%의 항돌연변이 효과를 보여서 녹차 첨가에 의해 활성이 현저히 높아졌으나 녹차 1%와 2% 첨가에서 큰 차이는 보이지 않았다. MNNG에 대해서도 이러한 경향은 마찬가지였고, 녹차추출물 1% 첨가된장에 죽염을 사용했을 때는 더욱 높은 항돌연변이 효과를 나타냈다. 녹차추출물을 첨가한 된장의 *in vitro* 항암효과를 살펴본 결과, PC-3 인체 전립선암세포에서 0.5 mg/mL로 시료를

처리했을 때 대조군인 일반된장이 46%의 항암활성을 나타낸 데 비하여 녹차추출물을 1% 첨가한 시료는 70%, 2% 첨가한 시료는 77%의 암세포 생존저해효과를 나타내어 첨가 농도가 증가할수록 인체 전립선암세포의 생존을 더 크게 억제함을 알 수 있었다. 또한 죽염을 사용했을 때(녹차 1% 첨가군) 항암활성이 더욱 높아졌으며, 녹차 2% 첨가와 비슷하거나 더 높은 항암효과를 보였다. 다른 인체 전립선암세포인 DU145를 이용한 항암효과 실험에서도 같은 경향을 보여서 녹차추출물을 첨가하거나 죽염을 사용함으로써 된장의 항돌연변이 및 항암활성을 증진시킴을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유 과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

문헌

- Park KY, Jung KO. 2005. Fermented soybean products as functional Foods: Functional properties of doenjang (fermented soybean paste). In *Asian Functional foods*. Shi J, Ho CT, Shahidi F, eds. CRC Press, Boca Raton, FL. p 555-596.
- Lee SJ. 2002. Studies on the enhancement of cancer preventive effects of doenjang. *MS Thesis*. Pusan National University.
- Kim SJ, Moon JS, Park IB, Kim JM. 2004. The quality of soybean paste (Doenjang) prepared with sea tangle, sea mustard, and anchovy powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 875-879.
- Ha JO, Park KY. 1998. Comparison of mineral content and external structure of various salts. *J Korean Soc Food Nutr* 27: 413-418.
- Hwang KM. 2004. Studies on the enhancement of chemopreventive and anticancer effects of doenjang. *PhD Dissertation*. Pusan National University.
- Kim SO, Park SY, Rhee SH, Park KY. 2003. Increased functional properties of chungkukjang prepared with bamboo salt. *J Kor Assoc Cancer Prev* 8: 286-296.
- Chung HY, Yokozawa T. 1995. Studies on antiaging and antimutagenic mechanism of epigallocatechin 3-O-gallate isolated from green tea. *Food Science Industry* 28: 46-58.
- Cheng J. 1992. The effects of Chinese tea on the occurrence of esophageal tumors induced by N-nitrosomethylbenzylamine in rats. *Prev Med* 21: 385-391.
- Yang F, Villiers WJ, Varilek GW. 1998. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 128: 2334-2341.
- Khan SG, Katitar SK, Agarwal R, Mukhtar H. 1992. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res* 52: 4050-4052.
- Machlin LJ, Bendich A. 1987. Free radical tissues damage. Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1: 441-445.
- Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. 2000. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obesity* 24: 252-258.
- Park JH, Ha AW, Cho JS. 2005. Effects of green tea-soybean paste on weights and serum lipid profiles in rats fed high fat diet. *Korean J Food Sci Technol* 37: 806-811.
- Jung BM, Roh SB. 2004. Physicochemical quality comparison of commercial doenjang and traditional green tea doenjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 132-139.
- Kong CS, Kim SO, Kil JH, Rhee SH, Han MS, Park KY. 2005. Increased anticancer effect of kochujang (Korean red pepper soybean paste) added with green tea extract and catechin. *Cancer Prev Res* 10: 206-210.
- Kim JH, Kim SI, Kim JG, Im DK, Park JG, Lee JW, Byun MW. 2006. Effect of green tea powder on the improvement of sensorial quality of chungkookjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 482-486.
- Setchell KDR, Cassidy A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758-767.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31: 347-364.
- Ames BN, Profet M, Gold LS. 1990. Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7782-7786.
- Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E. 1975. Hair dye are mutagenic: identification of variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2423-2427.
- Skehan P, Storeng R, Monks SA, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch J, Kenney S, Boyd KR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112.
- Kang WS, Lee YH, Chung HH, Kang MK, Kim TJ, Hong JT, Yun YP. 2001. Effects of green tea catechins on the lipid peroxidation and superoxide dismutase. *J Food Hyg Safety* 16: 41-47.
- Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32: 613-622.
- Kim MJ, Rhee SJ. 1994. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the removal of cadmium in rat. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 784-791.
- Sakanaka S, Shimura N, Aizawa M, Kim M, Yamato T. 1992. Preventive effect of green tea polyphenols against dental caries in conventional rats. *Biosci Biotech Biochem* 56: 592-594.
- Wang ZY, Hong JY, Huang MT, Reuhl KR, Conney AH, Yang CS. 1992. Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. *Cancer Res* 52: 1943-1947.
- Kada T, Kaneko K, Matsuzaki T, Hara Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. *Mutat Res* 150: 127-131.
- Faas MM, Van Der Schaaf G, Schipper M, Moes H. 2003. Glomerular immunoglobulin deposits induce glomerular inflammation in pregnant but not in non-pregnant rats. *J Reprod Immunol* 49: 57-63.
- Matsuzaki T, Hata Y. 1985. Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaish* 59: 129-134.
- Kzuko N, Midori Y, Chikusa T, Michiko I, Mitsuo N. 1991. Platelet aggregation inhibitory activity of tea extracts. *Nippon Shokuhin Kogyo* 38: 189-195.

31. Yeo SG, Kim IS, Ahn CW, Kim SB, Park YH. 1995. Desmutagenicity of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24: 160-168.
32. Oguni I, Chien SJ, Lin PZ, Hara Y. 1992. Protection against cancer risk by Japanese green tea. *Prev Med* 21: 332.
33. Han C, Xu Y. 1990. The effect of Chinese tea on the occurrence of esophageal tumor induced by N-nitrosomethylbenzylamine in rats. *Biomed Environ Sci* 3: 35-42.
34. Wang ZY, Agarwal R, Khan WA, Mukhtar H. 1992. Protection against benzo(a)pyrene and N-nitrosodiethylamine-induced lung and forestomach tumorigenesis in A/J mice by water extracts of green tea and licorice. *Carcinogenesis* 13: 1491-1494.
35. Yamane T, Takahashi T, Kuwata K, Oya K, Inagake M, Kitao Y, Suganuma M, Fujiki H. 1995. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach. *Cancer Res* 55: 2081-2084.

(2006년 11월 20일 접수; 2007년 1월 3일 채택)