



숙성기간으로 구분된 전통된장의 암세포 증식억제 효과

양혜정 · 허진영 · 홍상필*
한국식품연구원

Anti-proliferative Effects of Traditional Korean Doenjang across Different Aging Periods on Cancer Cell Lines

Hye Jeong Yang, Jinyoung Hur, Sang Pil Hong*
Korea Food Research Institute

Abstract

Doenjang is a major fermented soy-based food in Korea. Recent investigations have shown that fermented soybean foods have immunity-enhancing, anti-cancer, anti-obesity and anti-diabetic effects. Several studies also have reported that genistein and daidzein, which are easily absorbed in the body are produced in larger quantities in aged doenjang. The purpose of this study was to evaluate the variations in the anti-cancer effects of commercialized doenjang as it ages. Four groups were formed for this study according to aging periods of doenjang, namely short (under 5 years, S group), mid (under 10 years, M group), long (under 15 years, L group) and very long (over 15 years, E group). The anti-cancer effects of doenjang were determined by cell cytotoxicity assays in A549, YAC-1, and HepG2 cancer cell lines. Also, NK cell activity and splenocyte proliferation were assayed for cancer immunotherapy. The quantities of phenolic compounds in doenjang at different ages were also measured. The results showed that the anti-cancer effects increased in the S and M groups for all three cancer cell lines. Interestingly, similar to this result, splenocyte proliferation and NK activity were also the highest in the S and M groups. In contrast, the E group showed significantly reduced splenocyte proliferation. The quantity of phenolic compounds was similar to that of the anti-cancer results. Collectively, these results suggest that the fermentation period of doenjang plays a very important role in determining its anti-cancer effects.

Key Words: Doenjang, aging period, anti-cancer effect, NK activity, splenocyte

I. 서 론

전통된장은 대두를 발효 숙성시켜 제조된 메주의 미생물에 의하여 독특한 맛과 향기를 가지며 영양적으로 주요한 단백질 공급원인 우리나라 전통식품이다(Kwon & Shon 2004; Kang et al. 2016). 된장 및 간장 등의 전통 장류는 김치와 더불어 대표적인 발효 저장식품이며 가장 기본적인 양념 중 하나로 우리 식생활에 빼놓을 수 없는 식품이다.

전통된장 제조를 위해 메주를 띄울 때 곰팡이 등이 번식하여 전통간장과 전통된장에 아플라톡신이라는 발암물질이 생성된다는 논란에 대응하여 메주와 간장, 된장 등에 대한 연구가 꾸준히 진행되어, 충분히 숙성된 된장에는 발암물질이 남아 있지 않고 오히려 발효과정을 거쳐 인체에 흡수가 용이한 genistein, daidzein 등의 항암성분이 생성된다는 연구 결과들(Kwon & Shon 2004; Jung et al. 2006; Shim et

al. 2015)이 보고되고 있다. 따라서 전통된장은 생리활성 물질이 풍부한 항암식품(Jung et al. 2006; Shim et al. 2015)으로 재조명 받고 있다. 또한 장류의 발효과정에서 생긴 펩타이드, 아미노산, 당, 인지질 등의 대사산물들은 장의 주된 맛을 내는 성분이면서 각종 기능성 성분으로 알려져 우리나라 발효식품인 장류는 인체에 매우 건강한 식품으로 인식되고 있다(Kang et al. 2016).

최근 국내외 다수 연구자들의 의해 된장의 기능성에 대한 연구가 진행되고 있으며 특히 항암(Lee et al. 2011b; Park et al. 2015; Lee et al. 2020), 항산화(Shim et al. 2015; Park et al. 2018a), 면역증진(Lee et al. 2012; Ko et al. 2019; Na et al. 2019), 항당뇨(Kim et al. 2012; Yang et al. 2019), 항비만(Lee et al. 2011a; Bae et al. 2013; Kim 2017; Yang et al. 2019) 등과 관련된 연구결과가 다양하게 보고되고 있다.

*Corresponding author: Sang Pil Hong, Korea Food Research Institute, 245, Nongsangmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea Tel: +82-63-219-9098 Fax: +82-63-219-9360 E-mail: sphong@kfra.re.kr

한편, 숙성기간 수준별 장류의 기능성과 관련된 연구로 묵은 장일수록 항암성분의 함량이 많아져 효능이 크며 재래식, 시판개량식, 일본 미소된장 순으로 항암효과가 크고 재래식 된장 중에서도 단기숙성된 된장이나 10년 이상 숙성된 된장 보다 5년 정도 숙성된 된장이 가장 우수한 효능이 있다는 결과가 있다(Jung et al. 2006). Hur et al. (2020)은 간장의 경우 3-10년 정도 숙성된 전통간장이 일본간장, 단기숙성된 간장 및 15년 이상 숙성된 전통간장보다 항암효과가 좋게 나타났다는 조사결과를 보고한 바 있다.

암은 만성질환과 더불어 한국인의 주요 사망원인 중 하나이며, 암의 발생에 대한 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만 유전적인 소인과 발암물질 등의 여러 가지 환경적인 요인들에 의해 복합적으로 작용하여 발생된다. 암의 정확한 원인이 계속 연구되고 있는 만큼 암을 치료하는 방법도 다양하게 연구되고 있다. 화학항암제는 종류에 따라 다양한 내성 기전이 있으며 일반세포까지 공격하는 비특이적 특성으로 많은 부작용과 함께 내성으로 인한 재발의 위험을 갖고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 연구되고 있는 것이 면역 항암제이다. 자연살해세포(Natural killer cell)는 림프구계전구세포(common lymphoid progenitor)에서 발생되는데, 선천면역세포로서 감염세포 및 종양세포를 공격하는 역할을 하며 이러한 치료는 다양한 부작용과 내성으로 인한 암의 재발의 위험을 저해할 수 있어 최근 면역항암치료요법과 그 병용치료로 이루어진다(Vivier et al. 2008; Chodon et al. 2015; Fang et al. 2017).

식품 및 천연물로서의 항암 기능 소재는 암의 기전에 따라 다양하게 연구 개발 되고 있다. Messina et al. (1994)은 천연물로써 genestein을 함유한 콩 유래 식품을 많이 섭취했을 경우 전립선암, 유방암과 대장암에서 NK 세포의 활성이 높아졌다고 보고하였다. 이외에도 마늘추출물, 올금 유래 물질인 curcumin, 인삼추출물 등도 폐암세포주에서 NK 세포의 활성을 높였으며, 면역반응 증대 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다(Bhaumik et al. 2000; Hassan et al. 2003; Takeda & Okumura 2015). 또한, ashwagandha 추출물, 금귤추출물(kumquat extract), 겨우살이 추출물 등이 간암세포, 대장암세포, 혈액암세포에서 자연살해세포 활성으로 항암 효능이 있다고 연구되어 있어 다양한 식품 및 천연물 소재에서 자연살해세포 활성을 촉진시켜 새로운 면역세포치료제 연구 개발이 진행되고 있다(Braedel 2010; Barua et al. 2013; Nagahama et al. 2015; Rauf et al. 2018).

최근 된장의 기능성에 대한 연구가 진행되고 있으나 10년 이상 숙성된 된장에 대한 연구나 관련 기능성분에 대한 연구가 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 1-30년간 숙성된 전통된장을 이용하여 전통된장의 대표적인 암세포주 사멸 및 자연살해세포(NK cell) 활성을 확인하고 유효 폐놀화합물을 분석함으로써 전통된장의 항암효과를 규명하고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 시험물질

1) 실험재료

전통장류 제조업체에서 1년에서 30년 간 숙성된 된장 18종을 수집하였고, 일본 된장 2종은 2년 미만 숙성된 제품을 국내 마켓에서 구입하여 냉장보관 후 실험에 사용하였다. 본 논문상에 제품명은 기재하지 않고 <Table 1>과 같이 일련번호와 제조사의 약자로만 표기하였다. 또한 제품상에 제시된 숙성 기간에 따라 크게 4가지 숙성도로 구분하여 표기하였는데 통상적으로 상업적 유통이 가능한 1-3년 숙성제품은 단기숙성군(S group), 시중에 유통되지 않고 특정한 용도로 판매하거나 전통장류 제조업체에서 숙성보관 중인 5년 이상의 제품의 경우 숙성기간에 따라 5-7년 숙성된 제품은 중기숙성군(M group), 10-11년 숙성된 제품은 장기숙성군(L group), 15년 이상 숙성된 제품은 초장기숙성군(E group)으로 분류하였다. 10년 이상 숙성된 된장에 대한 연구는 보고된 바가 많지 않으나 1-3년 자연숙성된 된장을 단기숙성된 장으로 구분한 Kwon et al. (2004)의 보고, 10년 이상 숙성된 된장을 장기숙성된장으로 구분한 Jung et al. (2006)의 보고 등을 참조하여 분류하였다.

<Table 1> Aging periods and aging index on Traditional Korean Doenjang

Doenjang No. (manufacturer)	Aging Periods (years)	Aging index
D1 (SI)	1	S
D2 (SI)	3	S
D3 (OS)	3	S
D4 (SI)	5	M
D5 (SSS)	5	M
D6 (KSD)	5	M
D7 (JJY)	5	M
D8 (TKR)	5	M
D9 (DUP)	5	M
D10 (SI)	7	M
D11 (OS)	7	M
D12 (SI)	10	L
D13 (SSS)	10	L
D14 (KSD)	11	L
D15 (TKR)	11	L
D16 (DUP)	15	E
D17 (OS)	15	E
D18 (SI)	30	E
D19 (MK)	Japanese Doenjang1 (JD1)	
D20 (MK)	Japanese Doenjang2 (JD2)	

2) 시험물질의 조제

된장은 실험에 사용하기 전까지 냉동 보관하였고 모든 시료는 증류수에 완전히 용해 후 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter로 여과하여 실험에 사용하였다. 각 시료의 농도별 희석은 세포 배양 배지로 희석하였으며 제조된 시료는 냉장 보관 하에 7일 간격으로 새로 제조하였다.

2. 페놀화합물의 HPLC 분석

된장을 동결건조하여 분쇄한 된장분말 1 g에 70% MeOH 10 mL를 가하고 25°C에서 24시간 추출한 후 30분 동안 8,000×g에서 원심분리기(Beckman, USA, CA)를 이용하여 고형분을 제거하였다. 원심분리된 상등액만을 모아 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ syringe로 여과하여 실험에 사용하였다. Column은 YMC ODS-AM (250 mm×4.6 mm I.D. 5 μm)을 사용하였고, 이동상은 A: 0.1% acetic acid in water, B: 0.1% acetic acid in ACN:Water=75:25로 A용액을 0 min-88%, 18 min-78%, 28 min-72%, 35 min-62%, 48 min-52%, 54 min-32%, 58 min-0%로 2 min 흘려 준 뒤에 다시 처음 상태로 복귀하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min이었고, 시료주입량은 20 μL , column의 온도는 35°C로 사용하였으며 285 nm에서 HPLC (Waters, USA, MA)로 분석하였다. 표준물질은 Gallic acid, Protocatechuic acid, Hydroxybenzoic acid, Caffeic acid, Vanillic acid, Benzoic acid, Chlorogenic acid, Coumaric acid, Ferulic acid, Rutin, Naringin, Hesperidin, Hesperetin, Quercetin, Myricetin, Catechin (Sigma, USA)을 사용하여 정량하였다.

3. 항암 효능 평가

1) 시험 세포주

실험에 사용된 A549 (인체폐암세포) 세포, NK cell의 sensitive 세포로 알려진 lymphoma YAC-1 (마우스 림프종세포) 세포 및 HepG2 (인체간암세포) 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Korea)으로부터 구입하였으며 작용세포로 사용하기 위한 비장세포는 SD rat 5주령에서 분리하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 각 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA) 또는 10% bovine serum (BS; Gibco, USA)과 100 U/mL의 penicillin-streptomycin (Gibco, USA)을 첨가하여 배양하였다. 세포가 60-70% 정도 confluent되면 phosphate buffered saline solution (PBS)로 2번 씻어내고 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하고 배양액은 2-3일마다 교환하였다.

2) Cell viability assay

된장이 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈구

계수기(haematocytometer)로 계산된 세포를 비장세포의 경우 1×10^5 cells/well, A549의 경우 1×10^4 cells/well, YAC-1의 경우 1×10^5 cells/well, HepG2의 경우 1×10^4 cells/well로 하여 96 well plate에 분주한 뒤 10% fetal bovine serum과 100 U/mL의 penicillin-streptomycin^o 혼합된 minimum essential medium eagle (MEM; Gibco, USA)배지에 배양한 후 시료를 처리하여 반응시켰다. 그 다음 WST-1 시약(ITSBio, Seoul, Korea)을 100 μL 당 10 μL 씩 첨가하여 반응시킨 뒤 microplate reader (Infinite 200, Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 공식을 이용하여 산출하였다 (Park et al. 2018b).

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도}}{100}$$

4. 비장세포 분리

Balb/c 마우스의 비장을 적출하여 penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 함유한 RPMI 1640배지로 3회 세척한 후 균질화하였다. 세포 부유액을 70 μm nylon mesh를 이용하여 여과하고 원심분리하여 림프구를 모은 다음 배지에 부유시키고 원심분리하여 림프구를 분리하였다. effector cell로 사용하기 위하여, 10% FCS, 2 mM L-glutamine, penicillin, streptomycin을 함유한 RPMI 1640배지로 재 부유시키고, 이것을 37°C 5% CO₂ incubator에서 1-2시간 배양시켜 culture dish에 부착시켰다. 비부착성 NK cell을 원심분리하여 수집하였고 배양배지에 부유시킨 후 자연살해세포 활성 분석에 사용하였다. 본 연구에 사용된 동물실험은 인비보 동물실험윤리위원회의 승인(IV-17-1701-01) 후 수행하였다.

5. 자연살해세포(NK cell) 활성 분석

비장세포(effecter cell)는 96 well plate에 5×10^6 cells/ml로 농도별 시료와 함께 처리하고, YAC-1 세포(Target cell)를 이용하여 effecter cell과 target cell의 비율별(1:20)로 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 LDH 측정은 CytoTox detection kit (Takara)를 사용하여 측정하였으며, 반응액 내에 NAD의 산화로 의해 형성된 MTT는 490 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다(Park et al. 2018b).

6. 통계 분석

각 군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA (one-way analysis of variance test) Duncan 사후 검정 비교를 실시하여 $p<0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였다(SPSS V12, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

III. 결과 및 고찰

1. 된장의 폐암세포 증식 억제 효능

숙성기간에 따른 전통된장의 폐암세포에 미치는 영향을 확인하고자 A549의 세포 증식률을 비장세포의 세포 증식률과 비교하여 상대적 활성을 분석한 결과 1년산 된장 실험군(D1, S group)은 14.0%, 3년산 된장 실험군(D2, S group)이 13.8%, 11년산 된장 실험군(D15, L group)이 9.0%, 7년산 된장 실험군(D11, M group)이 8.6% 순으로 높은 활성을 보였다. 반면 일본 시판 된장(D19, D20)은 폐암세포의 증식은 증가하고 비장세포의 증식은 억제시키는 것으로 나타나 세포실험에서 항암 효과는 확인되지 않았다. 또한 <Figure 1>에는 비장세포 증식률에 대한 폐암세포 증식률의 차이를 상대적 활성값으로 계산하여 통계처리하여 각 된장군간의 유의성을 나타내었다.

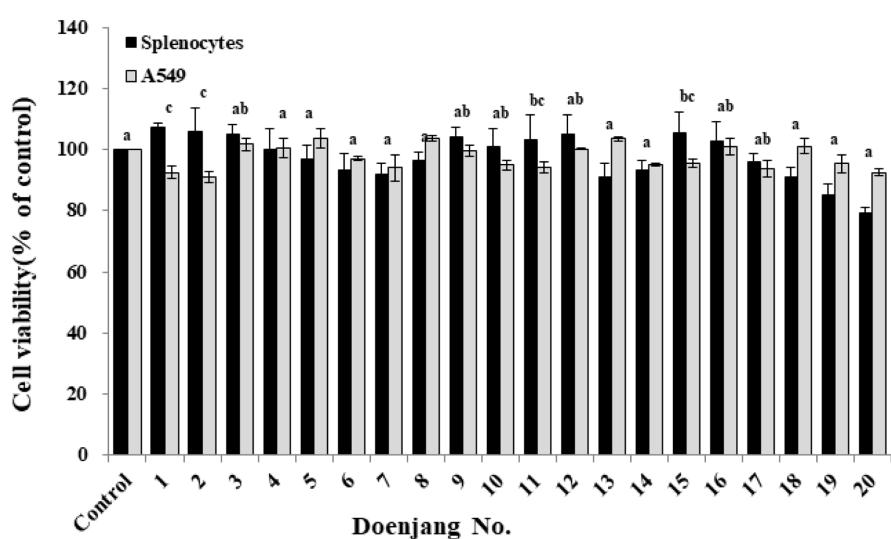
1-3년간 자연숙성시킨 전통 된장의 항암효과를 분석한 연구에서 된장의 물 분획물은 A549를, methanol 분획물은 인체 유방암 세포주인 MCF-7에서 높은 항암 활성을 보였고 3년 이하의 단기간 숙성된 전통 된장은 숙성기간이 길수록 항암 효과가 높다고 한 바 있다(Kwon & Shon 2004). 본 시험결과 전통된장은 폐암세포 증식과 관련하여 숙성시간에 따른 규칙적 양상을 보이지 않았다. 그러나 10년 이상 숙성한 것(L, E group) 보다는 7년 이하의 실험군(S, M group)에서 활성이 다소 높게 나타났으며, 일본 시판 된장은 모두 낮은 항암활성을 보이는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 콩 발효 식품의 발효 및 숙성 과정 동안에 생성된 다양한 기능성 물질이 여러 만성질환을 예방하는 역할을 한다는 연구(Park et al. 2007)와 유사한 결과를 가지며 이는 별호, 숙성 및 저

장과정에서 이화학적 변화, 미생물 및 유효성분 변화에 의한 것으로 유추할 수 있어 항암효과가 있는 폐놀 화합물의 성분을 분석하였다.

2. 된장의 림프종 암세포 증식 억제 효능

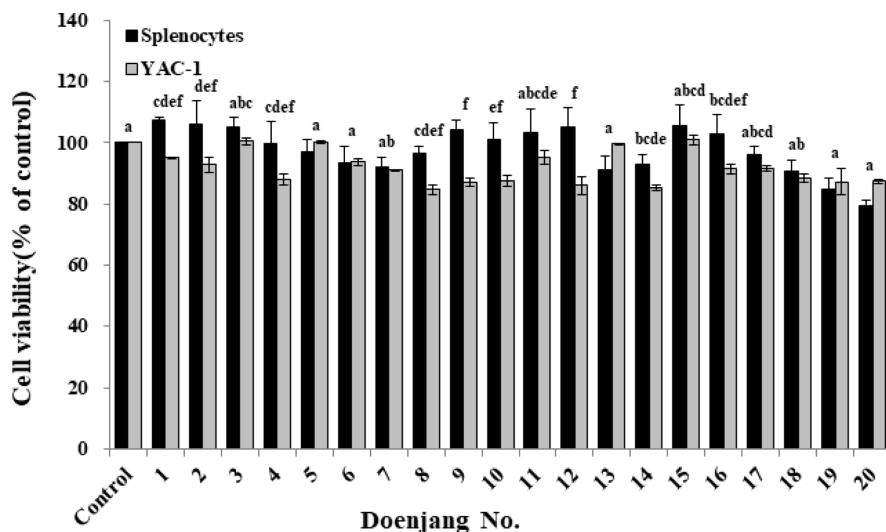
숙성기간에 따른 전통된장의 마우스 림프종 유래 암세포에 미치는 영향을 확인하고자 YAC-1 세포 증식률을 비장세포의 증식률과 비교하여 상대적 활성을 분석한 결과를 <Figure 2>에 나타내었다. 숙성기간에 따른 규칙적인 양상은 크게 보이지 않았으나 5-7년 정도 숙성된 중기숙성군(M group) 중 D4, D8, D9 및 D10군이 각각 11.7, 12.0, 16.2 및 13.4%로 높은 활성을 보였고, 1-3년 단기숙성군(S group)인 D1 및 D2도 각각 11.5 및 12.2%로 높게 나타났다. 반면 일본 시판 된장의 경우 비장세포의 증식을 억제하고 마우스 림프종 유래의 암세포의 증식을 증가시키는 것으로 나타났다. <Figure 2>에 비장세포 증식률에 대한 마우스 림프종 유래 암세포 증식률의 차이를 상대적 활성값으로 계산하여 통계처리하여 각 된장군간의 유의성을 표시하였다.

Park et al. (1997)은 재래식 된장의 항돌연변이성을 일본 된장, 청국장, 상품용 된장과의 차이로 비교해본 결과 재래식 된장의 활성이 가장 커으며 다음으로 상품용 된장, 청국장, 일본된장의 순이었다고 보고하였다. 본 시험결과 전통된장은 림프종 증식과 관련하여 숙성기간에 의존적인 경향을 크게 보이진 않았으나 7년 이하 숙성기간(S, M group)에서 비교적 림프종세포의 증식률을 가장 많이 감소시키는 것으로 확인되었으며 일본 시판 된장(D19, D20)은 모두 낮은 항암활성을 보이는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 7년 이하의 된장에서 폐암 세포의 증식을 억제시키는 앞선 연구와



<Figure 1> Effect of different aging period Doenjang on A549 and splenocyte proliferations.

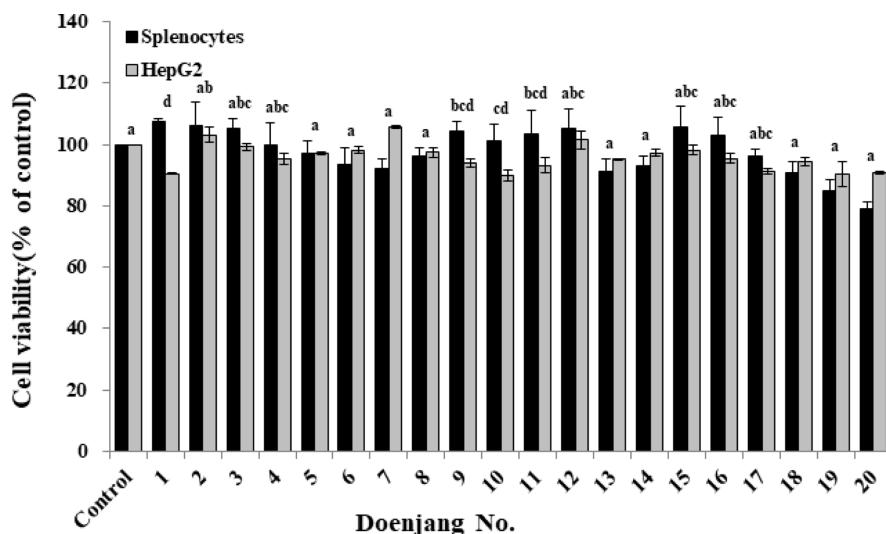
A549 cells were treated with 100 µg/mL of Doenjang for 24 h and the cell viability was determined by MTT. The data are shown as mean±SE. ^{a-c}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p<0.05$). Control: PBS treatment, A549: Human lung carcinoma cells. Doenjang number (1~20) is shown in Table 1.



<Figure 2> Effect of different aging period Doenjang on YAC-1 and splenocyte proliferations.

YAC-1 cells were treated with 100 µg/mL of Doenjang for 24 h and cell viability was determined by MTT. The data are shown as mean±SE.

^{a-f}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p<0.05$). Control: PBS treatment, YAC-1: Mouse lymphoma cells. Doenjang number (1~20) is shown in Table 1.



<Figure 3> Effect of different aging period Doenjang on HepG2 and splenocyte proliferations.

HepG2 cells were treated with 100 µg/mL of Doenjang for 24 h and cell viability was determined by MTT. The data are shown as mean±SE.

^{a-d}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p<0.05$). Control: PBS treatment, HepG2: Human hepatocarcinoma cells. Doenjang number (1~20) is shown in Table 1.

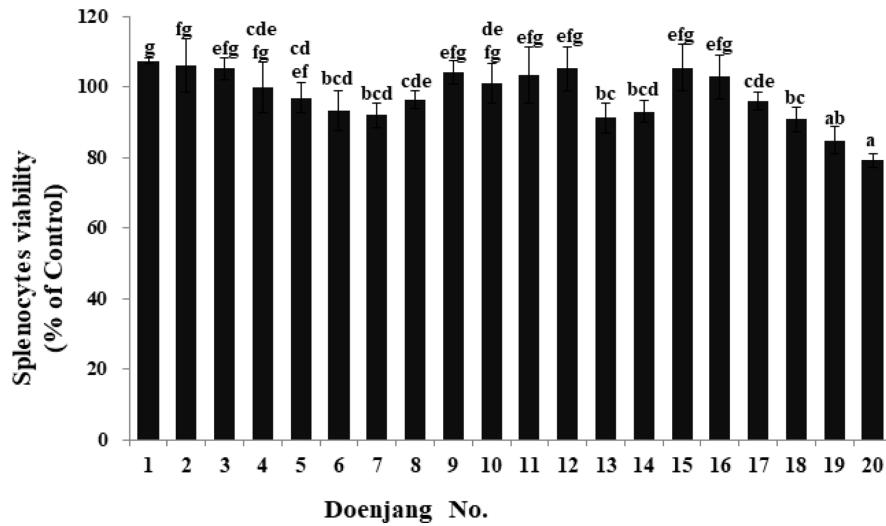
유사하게 나타나 장기 및 초장기에 비해 단기와 중기 숙성 시 항암 활성이 더 높았으며 이 또한 숙성 기간 중 나타날 수 있는 여러 화학적 변화로 인한 것으로 사료된다.

3. 된장의 간암세포 증식 억제 효능

된장이 간암세포에 미치는 영향을 확인하고자 HepG2의 세포 증식률을 비장세포의 세포 증식률과 비교하여 상대적 활성을 분석하였다. <Figure 3>에 나타낸 바와 같이 일본 시판 제품(D19, D20)은 비장세포와 HepG2의 세포 증식률을 모두 감소시키는 것으로 나타났으며 국내산 된장 중에는 일부

5년산 된장과 10-11년산 된장(L group) 및 15년산 된장(E group)에서 비장세포보다 HepG2의 증식률을 증가시키는 것으로 나타났다. 반면 단기숙성군(S group) 중 D1군이 15.9%, 5-7년 정도 숙성된 중기숙성군(M group) 중 D9, D10 및 D11군이 각각 10.0, 11.0 및 9.5%로 높은 활성을 보였다. <Figure 3>에는 비장세포 증식률에 대한 간암세포 증식률의 차이를 상대적 활성값으로 계산하여 통계처리하여 각 된장군간의 유의성을 표시하였다.

Lim et al. (2004)의 연구에 따르면 다양한 콩 발효 식품을 비롯하여 원재료인 콩과 밀가루의 메탄올 추출물을 이용



<Figure 4> Effect of different aging period Doenjang on splenocyte viability.

Cell viability was determined by MTT. ^{a-g}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p<0.05$). Doenjang number (1~20) is shown in Table 1.

한 항암 시험에서 AGS 인체 위암세포와 Hep 3B 인체 간암세포 및 HT-29 인체 대장암세포에서 콩된장이 청국장과 일본의 미소에 비해 암세포의 증식을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 전통된장은 간암세포 증식과 관련하여 숙성기간에 의존적인 경향을 크게 보이진 않았으나 7년 이하 숙성기간(S, M group)에서 비교적 높은 항암활성을 보인 군들이 나타났으며 반면 일본 시판 된장은 모두 낮은 항암활성을 보이는 것으로 조사되었다. 이는 앞선 결과들과 마찬가지로 단기와 중기 숙성기간의 된장에서 암세포 증식을 효과적으로 억제한 것으로 확인되었다.

4. 된장의 비장세포 증식 효능

비장세포의 증식은 종양세포 혹은 바이러스 감염세포 등의 내인성 항원에 대하여 유효한 방어력을 유도할 수 있을 거라 생각되어 된장이 비장세포 증식에 미치는 영향을 확인하고자 Balb/c mouse의 비장을 이용하여 세포 증식률을 분석하였다. <Figure 4>와 같이 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 24시간 경과 시 일본 시판 된장 D19 및 D20은 각각 79.2 ± 2.0 , $84.9 \pm 3.7\%$ 로 낮은 활성을 보여 비장세포의 생존율을 감소시키는 것으로 확인되었다. 반면 국내 전통된장의 경우 3년 숙성(S group)된장인 D2군과 D3군은 각각 106.2 ± 4.9 , $105.2 \pm 3.0\%$, 5-7년 숙성된장(M group)인 D9, D10 및 D11군은 각각 104.2 ± 3.4 , 101.1 ± 5.6 , $103.4 \pm 3.5\%$ 로 비교적 높은 활성을 보였다. 15년 이상 숙성된 된장인 D17군(E group)과 30년 숙성된 D18군(E group)은 각각 96.1 ± 2.5 및 $90.9 \pm 3.4\%$ 로 S나 M group에 비해 비장세포의 증식률이 다소 감소하는 경향을 보였다<Figure 4>.

비장(spleen)은 가장 큰 보조 면역장치(Secondary Lymphoid Organ)로 혈액에서 유래되는 항원에 대한 주된 보호 면역 반

응을 보인다. 비장세포의 증식은 면역 반응과 밀접한 관련을 나타내며, 그 크기나 수가 직접적인 지표로 이용될 수 있어 대표적인 면역지표로 사용된다. 따라서 비장세포의 증식은 종양세포 혹은 바이러스 감염세포 등의 내인성 항원에 대하여 유효한 방어력을 유도할 수 있다. 본 연구에서 숙성된 된장이 비장세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과 단기와 중기 숙성기간의 된장을 처리 시 비장세포의 증식률을 증가시켰으나 초장기 숙성 된장의 경우 다소 낮게 나타났다. 따라서 7년 이하 숙성기간(S, M group)을 거친 된장은 내인성 항원에 대한 방어력에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

5. 주요 페놀화합물 함량

콩 발효식품의 발효 및 숙성 과정 중에 생성된 다양한 기능성 물질이 여러 만성질환을 예방하는 역할을 있다고 보고된 바 있으며(Park et al. 2007), 특히 페놀성 화합물은 수산기를 통해 수소를 공여함으로서 체내의 활성산소를 효과적으로 제거하는 성질을 갖고 있기 때문에 항산화성, 항암성, 항균성, 혈액지질농도저하 등과 같은 생리활성을 가진다고 알려져 있다(Azuma et al. 1999; Ham et al. 1997), 따라서 본 연구에서는 페놀화합물과 항암효과와의 관련성을 확인하고자 숙성기간별로 페놀화합물의 성분을 분석하였다.

숙성기간에 따른 페놀화합물 분석 결과 총 페놀성분함량은 숙성기간 1-3년의 단기숙성그룹(S)의 경우 $588.22 \pm 17.87 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 5-7년의 중기숙성그룹(M)은 $620.88 \pm 44.41 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 10-11년의 장기숙성그룹(L)은 $479.22 \pm 19.13 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 15-30년의 초장기숙성그룹(E)은 $460.00 \pm 24.11 \text{ mg}/100 \text{ g}$, 일본된장의 경우 $225.56 \pm 42.24 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 로 나타났다<Table 2>. Jung et al. (2006)에서는 된장의 경우 숙성기간이 지날

수록 항암성분 함량이 많아져 효능이 크며 재래식, 시판개량식 및 일본 미소된장 순으로 항암효과가 크며 재래식된장 중에서도 10년 이상 숙성된 된장보다는 5년 정도 숙성된 된장이 더 우수한 효능이 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 페놀성분의 함량은 5년에서 7년 정도 숙성된 중기숙성그룹에서 가장 많게 나타났다. 특히 항암성분으로 잘 알려진 주요 페놀화합물의 함량을 HPLC로 분석한 결과 <Table 2>와 같이 rutin (Lin et al. 2012; Kunjiappan et al, 2019; Caparica et al. 2020)의 경우 초장기숙성그룹 및 일본된장에서는 검출되지 않은 반면 단기숙성군, 중기숙성군 및 장기숙성군에서는 각각 3.56 ± 1.30 , 8.99 ± 3.37 및 3.44 ± 3.16 mg/100 g의 함량을 보였다. 또한 대부분의 암세포주 사멸능과 관련하여 전통된장에서는 고르게 항암효능을 보였으나 일본식된장에서는 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 차이는 rutin 외에도 protocatechuic acid (Yew et al. 2019, 2020), chlorogenic acid (Naso et al. 2014; Deka et al. 2017; Bullo et al. 2019), epigallocatechin gallate (Lee et al. 2020; Minnelli et al. 2020), dihydroxy flavone (Seetharaman et al. 2017), quercetin (Shi et al. 2014; Daneshmehr 2015; Doshi et al. 2018), hesperetin (Stanisic et al. 2018; Lazer et al. 2018), myricetin (Kim et al. 2014; Xue et al. 2015; Sun et al. 2018) 등의 항암효능 성분들이 일본식 된장에서는 검출되지 않거나 함량이 낮은 반면 전통된장에서는 protocatechuic acid, chlorogenic acid, epigallocatechin gallate, dihydroxy flavone, quercetin, hesperetin, myricetin 이 각각 23.23-62.73, 7.04-12.41, 8.80-17.53, 229.97-334.67, 26.44-40.51, 68.45-115.29 및 2.04-4.40 mg/100 g 정도 고르게 함유하고 있는 것과 관련이 있음이 시사된다.

따라서 페놀 함량이 높은 7년 이하 숙성기간의 된장이 암세포 증식 억제 효과가 비교적 높게 나타났고 일본된장에서는 낮은 활성을 보였는데 이는 페놀화합물이 가진 생리활성도 어느 정도 기인한 것으로 사료된다. 즉 암세포 증식 억제

효능이 높은 7년 이하 숙성 된장군의 총 페놀함량이 가장 높게 나타났으며, 특히 7년 이하 숙성군(S, M)에서 높은 함량을 보인 페놀화합물 중 protocatechuic acid, EGCG, dihydroxy flavone, quercetin 및 hesperetin는 일본된장군(JD)에 비해 중기숙성군(M)에 각각 4.31, 3.69, 3.28, 2.68 및 2.26배 정도 높게 함유되어 있는 것으로 분석되었다<Table 2>.

6. 된장의 NK세포 활성 증가 효능

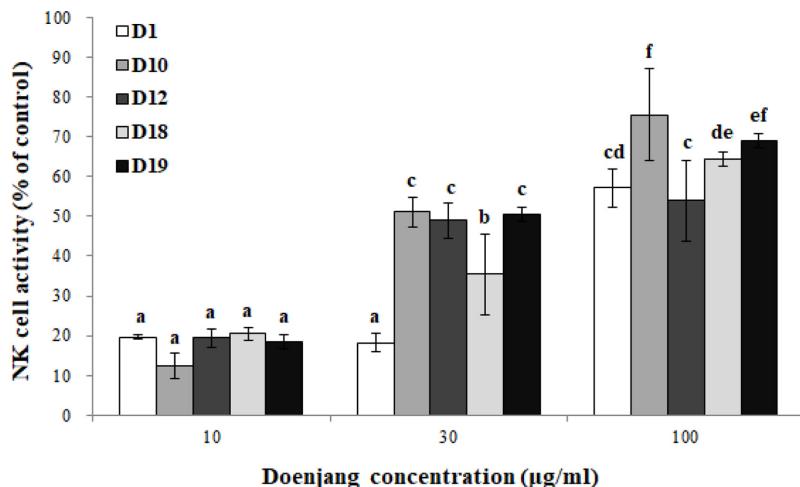
NK세포는 백혈구와 림프기관 폐, 간, 장에 존재하는데 외부에서 침투한 바이러스 감염된 세포나 암세포를 발견하면 즉시 공격하여 사멸시킨다. 또한 사이토카인을 분비하여 T 세포 등 다른 면역세포를 활성화시키기도 하며, 암 줄기세포를 효과적으로 제거해 재발, 증식, 전이를 막는 중요한 기능을 한다(Stanley et al. 2017). 본 연구에서는 전통된장의 항암효능 중 NK세포 활성 증가 효능을 숙성기간 별로 분석하고자 하였다. 숙성기간에 따른 효과를 확인하고자 20개의 된장 샘플 중 동일업체에서 생산된 된장 D1, D10, D12, D18 및 일본된장 D19를 선별하였으며 각각 1년 숙성(S group), 7년 숙성(M group), 10년 숙성(L group) 및 30년 숙성(E group)제품이다. NK cell 활성을 비교 분석한 결과 100 μg/mL 조건에서 1년산 된장 실험군은 $57.2\pm4.8\%$, 7년산 된장 실험군은 $75.5\pm11.6\%$, 10년산 된장 실험군은 $54.0\pm10.2\%$, 15년산 된장 실험군은 $64.4\pm1.7\%$, 일본 시판 제품의 된장 실험군(JD2 group)은 $68.9\pm1.8\%$ 로 나타나 Hur et al. (2020)의 간장 실험군의 결과와 유사하게 7년 숙성시킨 된장(M group)에서 자연살해세포의 활성능이 가장 높은 것으로 확인되었다<Figure 5>. 또한 D1, D10, D12 및 D18 및 일본된장(D19)의 총페놀함량은 각각 519.41 ± 9.89 , 699.91 ± 26.96 , 462.45 ± 40.88 , 425.06 ± 19.99 및 254.66 ± 10.34 mg/100 g으로 7년 숙성군인 D10에서 가장 높게 나타났다.

플라보노이드를 포함한 풀리페놀 화합물은 식품의 주요한 항산화 물질이다. 과일과 콩에 풍부하게 함유된 quercetin과

<Table 2> Change of phenolic compounds contents with different aging period of Doenjang

Phenolic compounds (mg/100 g)	S (D1~D3)	M (D4~D11)	L (D12~D15)	E (D16~D18)	JD (D19~D20)
Protocatechuic acid	62.73 ± 7.8^c	54.32 ± 26.68^c	39.85 ± 16.29^{bc}	23.23 ± 7.34^{ab}	12.6 ± 5.3^a
Chlorogenic acid	7.04 ± 1.2^b	8.80 ± 4.70^{bc}	10.17 ± 3.81^{bc}	12.41 ± 3.28^c	ND ^a
EGCG	12.05 ± 9.4^{ab}	17.53 ± 10.21^c	10.04 ± 6.45^{ab}	8.80 ± 3.55^{ab}	4.75 ± 5.6^a
Rutin	3.56 ± 1.30^{ab}	8.99 ± 3.37^b	3.44 ± 3.16^{ab}	ND ^a	ND ^a
Dihydroxy flavone	334.67 ± 28.0^c	309.28 ± 61.30^c	229.97 ± 45.25^b	249.75 ± 27.86^b	94.36 ± 26.3^a
Quercetin	40.51 ± 4.0^d	38.14 ± 8.53^{cd}	30.45 ± 3.46^{bc}	26.44 ± 7.0^b	14.25 ± 8.5^a
Hesperetin	115.29 ± 13.7^d	100.91 ± 32.43^{cd}	74.24 ± 23.62^b	68.45 ± 8.0^b	39.45 ± 11.1^a
Myricetin	2.85 ± 2.4^b	3.65 ± 2.1^b	$2.04\pm2.2a^b$	4.40 ± 0.5^b	ND ^a
Total	588.22 ± 17.87^c	620.88 ± 44.41^c	479.22 ± 19.13^b	460.00 ± 24.11^b	225.56 ± 42.24^a

Results shown are mean±SD of each group and different small letters represent statistical differences among the groups ($p<0.05$). Aging index S: 1~3yr M: 5~7yr L: 10~12yr E: 15~30yr. JD: Japanese doenjang. ND, not detected.



<Figure 5> NK cell mediated cytotoxicity in *Doenjang*-exposed effector cells at the effector/target cell ratio of 20:1. The data are shown as mean \pm SE. ^{a-f}Mean values not sharing a common superscript were significantly different among the groups ($p<0.05$). Doenjang number is shown in Table 1.

genistein은 주요한 항암효능을 갖는 폐놀성 화합물이라고 알려져 있다(Catherine et al. 1996). 대표적인 폐놀화합물인 resveratrol과 올리브 잎은 생체 내 다양한 면역 반응을 조절하고 NK세포의 활성을 증가시킨다고 연구된 바 있다(Grudzien & Rapak 2018). 또한 Orsolic et al. (2005)의 연구결과에 따르면, 꿀과 프로폴리스에 존재하는 폴리페놀화합물이 마우스에서 MCA sacroma로 유도한 복수종양의 항암효능이 있었고, NK 세포 활성이 증가시킨다는 것이 보고되었다(Orsolic et al. 2005). 이러한 연구들은 본 연구에서 폴리페놀함량이 증가되어 있는 숙성된장의 항암 효능과 NK 세포 활성을 뒷받침 할 수 있다고 생각된다.

NK 세포는 세포살해 활성을 갖고 있으며, 면역세포치료는 인체의 면역세포인 림프구계전구세포(common lymphoid progenitor)에서 기원되며 암세포를 인지하면 다른 활성화 과정 없이 암세포를 즉시 공격할 수 있는 세포로서 NK 세포 표면의 다양한 면역수용체를 통해 정상세포와 암세포를 구분할 수 있다. 다양한 항암면역세포 중 NK 세포는 직접적으로 암세포의 발생, 전이를 억제하고 암의 재발에 관여하는 암줄기세포를 효과적으로 제거 할 수 있어 많은 장점을 갖고 있다(Castriconi et al. 2009; Long et al. 2013; Terme et al. 2013). 암의 재발에 가장 중요한 암 줄기세포를 효과적으로 제어할 수 있는 것이 NK세포의 큰 장점이기에 이러한 측면에서 항암치료연구에 NK 세포 활성제를 찾는 것이 큰 의미가 있다고 할 수 있다. 현재 NK 세포를 이용한 항암 면역치료의 경우 NK 세포 활성수용체와 더불어 NK세포 억제 수용체에 초점이 맞추어져 있다. 따라서 NK 세포 활성화 소재 발굴과 그 기전에 대한 연구가 활발히 진행된다면 다양한 암을 보다 효과적으로 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 요약 및 결론

대표적인 전통 발효식품인 된장의 항암 효능을 확인하기 위해 1-30년간 숙성한 된장을 이용하여 한국인 유발률이 높은 폐암, 간암, 림프암 3종의 암세포주에 대한 억제활성을 확인하였다. 폐암세포주 A549의 증식률을 비장세포의 증식률과 비교하여 상대적 활성을 분석한 결과 1년산 된장(D1)은 14.0%, 3년산 된장(D2)이 13.8%, 11년산 된장(D15)이 9.0%, 7년산 된장(D11)이 8.6% 순으로 활성을 보였다. 림프 종 유래 암세포주 YAC-1의 경우 5-7년 정도 숙성된 D4, D8, D9 및 D10군이 각각 11.7, 12.0, 16.2 및 13.4%로 높은 활성을 보였고, 1-3년 단기숙성된 D1 및 D2도 각각 11.5 및 12.2%로 높게 나타났다. 간암세포주 HepG2의 경우 D1 군이 15.9%, D9, D10 및 D11군이 각각 10.0, 11.0 및 9.5%로 높은 활성을 보였다. 반면 일본 시판 된장(D19, D20)의 경우 3종의 암세포주에서 모두 암세포의 증식은 증가하고 비장세포의 증식은 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 숙성기간에 따른 규칙적인 양상은 크게 보이지 않았으나 주로 숙성기간이 7년 이하인 전통된장(S, M group)에서 암세포 증식 억제율이 높게 나타나고 비장세포의 증식을 증가시키는 것으로 확인되었다. 또한 NK cell 활성을 비교 분석한 결과 1년산 된장은 $57.2\pm4.8\%$, 7년산 된장은 $75.5\pm11.6\%$, 10년산 된장은 $54.0\pm10.2\%$, 15년산 된장 $64.4\pm1.7\%$, 일본 시판 제품은 $68.9\pm1.8\%$ 로 나타나 7년 숙성시킨 된장(M group)에서 자연살해세포의 활성능이 가장 높은 것으로 확인되었다.

폐놀성분을 분석한 결과, 총 폐놀성분함량은 숙성기간 1-3년의 단기숙성그룹(S)의 경우 $588.22\pm17.87\text{ mg}/100\text{ g}$, 5-7

년의 중기숙성그룹(M)은 620.88 ± 44.41 mg/100 g, 10-11년의 장기숙성그룹(L)은 479.22 ± 19.13 mg/100 g, 15-30년의 초장 기숙성그룹(E)은 460.00 ± 24.11 mg/100 g, 일본된장의 경우 225.56 ± 42.24 mg/100 g로 나타났다. 항암성분으로 잘 알려진 주요 폐놀화합물 중 rutin, protocatechuic acid, chlorogenic acid, epigallocatechin gallate, dihydroxy flavone, quercetin, hesperetin, myricetin 등은 일본된장에서는 검출되지 않거나 함량이 낮은 반면 전통된장에서는 비교적 높은 함량으로 분포되어 있는 것으로 분석되었다.

본 연구결과 숙성기간에 따른 전통된장의 암세포증식 억제 효능, NK세포 활성 및 유효한 폐놀화합물을 분석함으로써 잠재적인 항암 효능을 확인하였다. 실험을 통해 활성이 높게 선별된 된장군에서 미생물을 분리하고 이를 이용하여 된장을 제조하고 추후 동물실험이나 기작연구, 주요 유효성분 분석 등의 추가 연구를 통해 항암효능의 검증이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구결과는 한국식품연구원 주요사업(E0201100-01)의 지원을 받아 연구 되었습니다.

저자 정보

양혜정(한국식품연구원 식품기능연구본부, 선임연구원, 0000-0002-2839-7949)

허진영(한국식품연구원 식품기능연구본부, 선임연구원, 0000-0003-1292-9290)

홍상필(한국식품연구원 전략기술연구본부, 책임연구원, 0000-0002-4060-0129)

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Azuma K, Nakayama M, koshika M, Lppoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Ito H, Higashio H. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. J Agric Food Chem., 47:3963-3966
- Bae CR, Kwon DY, Cha YS. 2013. Anti-obesity effects of salted and unsalted *Doenjang* supplementation in C57BL/6J mice fed with high fat diet. J Korean Soc Food Sci Nutr, 42:1036-1042
- Barua A, Michael JB, Bitterman P, Abramowicz JS, Sharma S, Basu S, Lopez H, Bahr JM. 2013. Dietary supplementation of Ashwagandha (*Withania somnifera*, Dunal) enhances NK cell function in ovarian tumors in the laying hen model of spontaneous ovarian cancer. Am J Reprod Immunol., 70:538-550
- Bhaumik S, Jyothi MD, Khar A. 2000. Differential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells. FEBS Lett., 483:78-82
- Braedel RS. 2010. Immunomodulatory effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: review of clinical trials. Forsch Komplementmed., 17:63-73
- Bullo S, Buskaran K, Baby R, Dorniani D, Fakurazi S, Hussein MZ. 2019. Dual drugs anticancer nanoformulation using graphene oxide-peg as nanocarrier for protocatechuic acid and chlorogenic acid. Pharm. Res., 36:91-102
- Caparica R, Julio A, Araujo ME, Baby AR, Fonte P, Costa JG, Almeida TS. 2020. Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells. Biomolecules, 4:233
- Castriconi R, Daga A, Dondero A, Zona G, Poliani PL, Melotti A, Griffero F, Marubbi D, Spaziente R, Bellora F, Moretta L, Moretta A, Corte G, Bottino C. 2009. NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. J Immunol. 182:3530-9
- Catherine RE, Miller N, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med., 20: 933-956
- Chodon T, Koya RC, Odunsi K. 2015. Active Immunotherapy of Cancer. Immunol Invest., 44:817-836
- Daneshmehr S. 2015. Carbon nanotubes for delivery of quercetin as anticancer drug: theoretical study. Procedia Mater Sci., 11:131-136
- Deka S, Gora S, Manna D, Trivedi V. 2017. Evidence of PKC binding and translocation to explain the anticancer mechanism of chlorogenic acid in breast cancer cells. Curr. Mol. Med., 17:79-89
- Doshi GM, Pawar MK, Chavda KH. 2018. Quantification of rutin and quercetin by HPTLC/HPLC and in vitro immunomodulatory and anticancer activities of *Capparis moonii* fruits extracts. Int J Basic Clin Pharmacol., 7:153
- Fang F, Xiao W, Tian Z. 2017. NK cell-based immunotherapy for cancer Semin Immunol., 31:37-54
- Grudzien M, Rapak A. 2018. Effect of natural compounds on NK cell activation. J Immunol Res., 2018:1
- Ham SS, Hong JK, Lee JH. 1997. Antimutagenic effects of juices from edible korean wild herbs. J Food Sci Nutr., 2:155-164
- Hassan ZM, Yaraee R, Zare N, Ghazanfari T, Sarraf AH, Nazori B. 2003. Immunomodulatory affect of R10

- fraction of garlic extract on natural killer activity Int Immunopharmacol., 3:1483-1489.
- Hur JY, Kim MJ, Hong SP, Yang HJ. 2020. Anticancer effects of *Ganjang* with different aging period. J. Korean Soc. Foo Cult., 24:805-812
- Jung KO, Park SY, Park KY. 2006. Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of *Doenjang*. Nutrition, 22:539-545
- Kang HJ, Kim JH, Kim RR, Kim KS, Hong SP, Kim MJ, Yang HJ. 2016. Quality characteristics and compositon profile of traditonal *Doenjang* and manufactured *Doenjang* during Storage Time. Korean J. Food Nutr., 29:785-794
- Kim AR, Lee JJ, Cha SS, Jang HC, Lee MR. 2012. Effect of soybeans, *Chungkukjang*, and *Doenjang* on blood glucose and serum lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr., 41:621-629
- Kim JY. 2017. Anti-obesity Effects of black soybean *Doenjang* in C57BL/6 mice. J. Life Sci., 27:1486-1493
- Kim ME, Ha TK, Yoon JH, Lee JS. 2014. Myricetin induces cell death of human colon cancer cells via BAX/BCL2-dependent pathway. Anticancer Res., 34:701-706
- Ko JW, Chung YS, Kwak CS, Kwon YH. 2019. *Doenjang*, a Korean traditional fermented soybean paste, ameliorates neuroinflammation and neurodegeneration in mice fed a high-fat diet. Nutrients, 11:1702
- Kunjiappan S, Theivendran P, Baskararaj S, Sankaranarayanan B, Palanisamy P, Saravanan G, Arunachalam S, Sankaranarayanan M, Natarajan J, Somasundaram B, Wadhwan A. 2019. Modeling a pH-sensitive Zein-co-acrylic acid hybrid hydrogels loaded 5-fluorouracil and rutin for enhanced anticancer efficacy by oral delivery. 3Biotech., 9:185
- Kwon SH, Shon MY. 2004. Antioxidant and anticarcinogenic effects of traditional *Doenjang* during maturation periods. Korean J Food Preserv., 11:461-467
- Lazer LM, Sadhasivam B, Palaniyandi K, Muthuswamy T, Ramachandran I, Balakrishnan A, Pathak S, Narayan S, Ramalingam S. 2018. Chitosan-based nano-formulation enhances the anticancer efficacy of hesperitin. Int J Biol Macromol, 107:1988-1998
- Lee CH, Yun Y, Song KS, Kim YS. 2012. Immunostimulatory effects of traditional *Doenjang*. J Korean Soc Food Sci Nutr., 40:1227-1234
- Lee JH, Lim YI, Lee SY, Kim JH, Park KY. 2020. Increased qualities and in vitro anticancer effects of *Doenjang* fermented in Onggi. Korean J Food Preserv., 27:346-355
- Lee JJ, Kim AR, Lee H, Kim CH, Jang HC, Lee MR. 2011a. Effects of soybean, *Cheonggukjang* and *Doenjang* on serum cholesterol level and weight reduction in rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. Korean J Food Preserv., 18: 226-235
- Lee KI, Park KY, Ahn HK. 2011b. The anticancer effects of *Doenjang* made with various kinds of Salt. Korean J Culi Res., 17:241-252
- Lee YG, Kim Y, Jung W, Kim MK, Chong Y. 2020. An amide analog of epigallocatechin gallate shows preferential cytotoxicity toward triple-negative breast cancer cells. Bull Korean Chem Soc., 41:496-497
- 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
- Lin JP, Yang JS, Lin JJ, La K, Lu HF, Ma CY, Sai-Chuen WR, Wu KC, Chueh FS, Gibson WW, Chung JG. 2012. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. Environ. Toxicol., 27:480-484
- Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. Annu Rev Immunol., 31:227-258
- Messina MJ, Persky V, Setchell DR, Barnes S. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. Nutr Cancer, 21:113-131
- Minnelli C, Laudadio E, Mobbili G, Galeazzi R. 2020. Conformational insight on WT- and mutated-egfr receptor activation and inhibition by epigallocatechin-3-gallate: over a rational basis for the design of selective non-small-cell lung anticancer agents. Int J Mol Sci., 21:1721
- Na YG, Choi BY, Yeo SH, Kim SY. 2019. Anti-inflammatory effect of fermented *Doenjang* containing. Korean J. Food Nutr., 32:651-661
- Nagahama K, Eto N, Shimojo T, Kondoh T, Nakahara K, Sakakibara Y, Fukui K, Suiko M. 2015. Effect of kumquat (*Fortunella crassifolia*) pericarp on natural killer cell activity in vitro and in vivo. Biosci Biotechnol Biochem., 79:1327-1336
- Naso LG, Valcarcel M, Roura-Ferrer M, Kortazar D, Salado C, Lezama L, Rojo T, Gonzalez-Baro AC, Williams PAM, Ferrer EG. 2014. Promising antioxidant and anticancer (human breast cancer) oxidovanadium (IV) complex of chlorogenic acid. Synthesis, characterization and spectroscopic examination on the transport mechanism with bovine serum albumin. J Inorg Biochem., 135:86-99
- Orsolic, S. Terzic, L. Sver & I. Basic. 2005. Polyphenolic

- compounds from propolis modulate immune responses and increase host resistance to tumour cells. *Food Agric Immunol.*, 16:165-179
- Park ES, Lee JY, Park KY. 2015. Anticancer effects of black soybean *Doenjang* in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 44:1270-1278
- Park JW, Lee YJ, Yoon S. 2007. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Cult.*, 22:353-358
- Park KY, Lim SY, Rhee SH. 1997. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Doenjang*. *J Korean Assoc Cancer Prev.*, 1:99-107
- Park SM, Oh J, Kim JE, Kim JS. 2018a. Effect of drying conditions on nutritional quality and in vitro antioxidant activity of traditional *Doenjang*. *Prev Nutr Food Sci.*, 23:144-151
- Park YM, Lee HY, Kang YG, Park SH, Lee BG, Park YJ, Oh HG, Moon DI, Kim YP, Park DS, Lee HM, Kim OJ, Yang HJ, Kim MJ, Lee YR. 2018b. Immune-enhancing effects of *Portulaca oleracea* L. based complex extract in cyclophosphamide induced splenocytes and immuno-suppressed rats. *Food Agri. Immunol.* 30:13-24
- Rauf A, Imran M, Khan IA, Ur-Rehman M, Gilani SA, Mehmood Z, Mubarak MS. 2018. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review., *Phytother Res.*, 32:2019-2130
- Seetharaman P, Gnanasekhar S, Chandrasekaran R, Chandrasekaran G, Kadarkarai M, Sivaperumal S. 2017. Isolation and characterization of anticancer flavone chrysin (5,7-dihydroxy flavone)-producing endophytic fungi from *Passiflora incarnata* L. leaves. *Ann Microbiol.*, 67:321-331
- Shi ZH, Li NG, Tang YP, Shi QP, Zhang W, Zhang PX, Dong ZX, Li W, Zhang X, Fu HA, Duan JA. 2014. Synthesis, biological evaluation and SAR analysis of O-alkylated analogs of quercetin for anticancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24:4424-4427
- Shim JH, Park ES, Kim IS, Park KY. 2015. Antioxidative and anticancer effects of *Doenjang* prepared with bamboo salt in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 44:524-531
- Stanisic D, Costa AF, Favaro WJ, Tasic L, Seabra AB, Duran N. 2018. Anticancer Activities of Hesperidin and Hesperetin In vivo and their Potentality against Bladder Cancer. *J Nanomed Nanotechnol.*, 9:1-6
- Stanley J, Oiseth, Mohamed S, Aziz. 2017. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.* 3:250-61
- Sun W, Tao Y, Yu D, Zhao T, Wu L, Yu W, Han W. 2018. Myricetin exerts potent anticancer effects on human skin tumor cells. *Trop J Pharm Res.*, 17:1067-1072
- Takeda K, Okumura K. 2015. Interferon--mediated natural killer cell activation by an aqueous Panax ginseng extract. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2015:Article ID 603198
- Terme M, Fridman WH, Tartour E. 2013. NK cells from pleural effusions are potent antitumor effector cells. *Eur J Immunol.*, 43:331-4
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.*, 9:503-10
- Xue W, Song BA, Zhao HJ, Qi XB, Huang YJ, Liu XH. 2015. Novel myricetin derivatives: Design, synthesis and anticancer activity. *Eur J Med Chem.*, 97:155-163
- Yang HJ, Kim MJ, Hong SP. 2019. Anti-diabetic effect of *Gangang* and *Doenjang* in different aging periods. *Korean J Food Preserv.*, 26:200-307
- Yew YP, Shameli K, Mohamad SE, Lee KX, Teow SY. 2020. Green synthesized montmorillonite/carrageenan/Fe₃O₄ nanocomposites for pH-responsive release of protocatechuic acid and its anticancer activity. *Int J Mol Sci.*, 21:4851
- Yew YP, Shameli K, Mohamad SE, Nagao Y, Teow SY, Lee KX, Mohamed Isa ED. 2019. Potential anticancer activity of protocatechuic acid loaded in montmorillonite/Fe₃O₄ nanocomposites stabilized by seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Int J Pharm.*, 572:11874

Received September 16, 2020; revised October 15, 2020; revised October 29, 2020; accepted October 30, 2020