

제주 재래식된장의 생리적 특성

황준호^{1,2} · 오유성¹ · 임자훈¹ · 박지은¹ · 김미보⁴ · 윤훈석³ · 임상빈^{1,4*}

¹제주대학교 생명과학기술혁신센터, ²제주대학교 생물학과
³제주대학교 아열대원예산업연구소, ⁴제주대학교 식품생명공학과

Physiological Properties of Jeju Traditional *Doenjang*

Joon-Ho Hwang^{1,2}, You-Sung Oh¹, Ja-Hun Lim¹, Ji-Eun Park¹, Mi-Bo Kim⁴,
Hoon Seok Yoon³, and Sang-Bin Lim^{1,4*}

¹Biotechnology Regional Innovation Center,

²Dept. of Biology, ³Subtropical Horticulture Research Institute, and

⁴Dept. of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

Four Jeju traditional *Doenjangs* (JTD), a traditional fermented soybean paste, were extracted and fractionated using organic solvents, and their physiological properties were evaluated such as total phenolic contents (TPC), antioxidant capacity (DPPH and superoxide free radical scavenging), inhibitory effect of ACE and α -glucosidase, and anti-inflammatory and anti-cancer activities. Ethyl acetate fractions had the highest TPC (201.8~305.4 $\mu\text{g/g}$) and DPPH radical scavenging activity (37.5~59.9%). Buthanol fractions had the highest superoxide anion radical scavenging activity (56.3~85.1%), and the activities of JTD1 (81.7%) and JTD4 (85.1%) were almost the same as that of ascorbic acid (82.2%) as the reference material. Inhibitory activities of ACE were 23.6~74.5% in methanol extracts, and those of α -glucosidase were 72.0~80.2% in dichloromethane fractions compared with 57.4% in acarbos as the reference. Inhibitory activities of NO production in LPS-induced RAW 264.7 were the highest as 17.3~29.0 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) in ethyl acetate fractions, and cell toxicities were not detected in all fractions. Ethyl acetate fractions of JTD1-3 showed no inhibitory activities, but that of JTD4 showed 21% of inhibitory activity of cell growth against human genital skin fibroblast cell line HS-68. Cell growth of human colon cancer cell line HT-29 was not inhibited by ethyl acetate fractions of JTD1 and 2, but was inhibited by those of JTD3 and 4 at more than 50 $\mu\text{g/mL}$. JTD3 and JTD4 showed the growth inhibition of breast adenocarcinoma cell line (MCF-7) by 30.9% and 34.7% at 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Key words: *Doenjang*, antioxidant, ACE, α -glucosidase, anti-inflammatory, anti-cancer activity

서 론

사람의 몸은 외부감염이나 피부조직의 모세혈관이 손상되면 섬유아세포가 활발하게 증식되고 결합조직 내부로 림프구의 침윤과 더불어 섬유모세포 및 대식세포의 수가 증가한다. 이로 인하여 입파구에서 분비되는 인터루킨은 effector 입파구를 활성화시키고 hyaluronidase, elastase 및 collagenase와 같은 각종 분해효소 및 prostaglandin 등의 염증 매개물의 형성을 촉진하여 결합조직을 파괴시켜 염증을 유발한다(1). Nitric oxide(NO)는 이러한 염증 유발물 중 하나인데, NO synthases(NOSs)에 의해 L-아르기닌으로부터 생성되는 유리기로, 체내방어 및 신호전달, 혈관확장 등의 2차 신호 전달자로서 다양한 생리기능을 가진다(2,3).

또한 현대인들은 식습관의 변화 또는 다양한 스트레스로

인하여 성인병 발병률이 증가되고 있다. 성인병 중에서 당뇨병 환자 수는 빠른 속도로 증가하고 있을 뿐만 아니라, 발병 연령이 점차 낮아지고 있다. 우리나라 당뇨병 환자들은 대부분이 인슐린 비의존형 당뇨병을 갖는데, 인슐린 비의존형은 제2형 당뇨병으로 치료약물에 대한 연구는 당의 소화흡수를 제어할 목적으로 α -glucosidase 저해제에 대한 연구가 천연물에서 활발하게 진행되고 있다(4,5).

특히 식품에서의 연구는 영양학적 측면보다는 생리기능적 측면을 중심으로 이루어지고 있는데, 전통 발효식품에서 향산화, 항암 및 면역 활성화와 같은 기능성 규명 또는 소재 발굴에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(6). 콩은 단백질과 지질이 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 필수아미노산과 불포화지방산이 균형 있게 분포되어 있는 작물로 오랜 기간 동안 우리 국민의 식생활에서 큰 비중을 차지하여 왔

*Corresponding author. E-mail: sblim@jejunu.ac.kr
Phone: 82-64-754-2135, Fax: 82-64-726-3539

다. 콩의 기능성 성분으로는 isoflavones, saponins, tocopherol 등이 알려지고 있다(7). 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 태국 등 여러 나라에서는 콩을 이용한 전통 발효식품을 많이 섭취하고 있는데, 최근에는 전통 콩 발효식품에서 항산화 및 면역 활성 등 기능성에 관한 연구보고가 활발하게 진행되고 있다(8).

된장은 콩을 발효시켜 만든 우리나라의 전통식품으로 현대인의 식생활에서도 중요한 부분을 차지하고 있으며, 우수한 영양소와 생리적 기능에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 된장의 발효과정에서 생성되는 daidzein, genistein, glycitein과 같은 isoflavones는 숙성기간에 따라 다양한 형태로 변하며, 항산화 활성에 중요한 인자로 주목 받고 있는데, protease inhibitor, phytic acid 등과 함께 항암, 항돌연변이 및 면역 활성 등에 관여하는 것으로 알려지고 있다(9). 특히 콩의 발효 과정 중 여러 미생물에 의하여 고분자의 단백질이 분해되어 생성되는 peptide류는 angiotensin I를 angiotensin II로 전환시키는 angiotensin I-converting enzyme(ACE)의 활성을 저해하여 혈압을 낮추는 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(10).

산업화에 의해 장류시장은 대규모 공장식 된장이 소비시장의 주류를 이루고 있으나, 전통장류의 기능성들이 세계적으로 주목받고 있다. 따라서 이번 연구는 제주 재래식된장의 다양한 생리활성을 분석하여 제주 재래식된장의 생리적 특성을 밝히는 기초자료로 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시료의 제조

본 연구에 사용된 시료는 도내 전통식품 제조업체에서 생산한 된장제품(JTD1, 2, 3, 4)을 수거하여 사용하였다. 된장의 용매 추출과 분획은 시료 100 g에 80% 메탄올(1 L)을 가하여 초음파(Crest #1875, Crest Ultrasonics, Trenton, NJ, USA)로 1시간씩 3회 추출한 후 상정액을 감압농축 하여 메탄올 추출물(MeOH)을 얻었다. 분획물은 메탄올 추출물(10 g)을 증류수 1 L에 현탁시킨 후, 디클로로메탄(DCM), 에틸 아세테이트(EtOAc), 부탄올(BuOH), 물(Water)을 순차적으로 가하여 얻었다(Fig. 1).

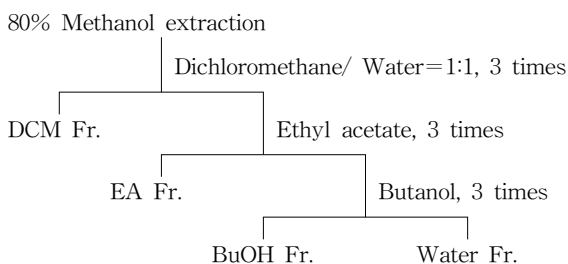


Fig. 1. Flow diagram of extraction and fractionation procedure from Jeju traditional *Doenjang*.

총 페놀 함량 측정

추출 및 분획물의 총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법(11)으로 측정하였다. 시료 용액(1 mg/mL) 100 µL과 증류수 900 µL을 혼합하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagent 100 µL을 가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에서 반응시켰다. 이 용액에 20% Na₂CO₃ 300 µL을 넣어 혼합한 다음 증류수를 가하여 2 mL로 조정하였다. 이 용액을 23°C에서 2시간 동안 방치한 후, 760 nm에서 흡광도를 측정하였고, tannic acid(1 mg/mL)를 이용한 검량선과 비교하여 총 페놀 함량을 산출하였다.

DPPH 자유라디칼 소거활성 측정

전자공여능은 Blois 방법(12)에 의한 DPPH 자유라디칼 소거법으로 측정하였다. 즉, 메탄올에 녹인 시료를 96 well plate에 100 µL씩 분주하고 0.4 mM DPPH((1,1)-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군으로는 합성항산화제인 butylated hydroxy anisole(BHA)를 사용하였다. 3회 반복 실험하여 평균값±표준편차로 나타내었다.

Superoxide anion 소거활성 측정

Superoxide anion 소거활성은 PMS/NADH system을 이용하여 생성된 superoxide anion의 양을 NBT 환원법으로 517 nm에서 측정하였다(13). 반응액은 각 시료 50 µL과 125 µM NADH와 63 µM의 NBT를 PBS(pH 8.4) 150 µL에서 준비하였고, 8 µM의 PMS 100 µL을 첨가하여 superoxide 생성을 유도하였다. Superoxide anion 소거활성은 각각 생성된 superoxide의 흡광도를 시료를 가하지 않은 대조구와 비교하여 저해활성도(%)로 나타내었다. 대조군으로는 항산화제로 알려져 있는 ascorbic acid를 사용하였다. 3회 반복 실험하여 평균값±표준편차로 나타내었다.

ACE 저해활성 측정

된장 메탄올 추출물(1 mg/mL) 0.05 mL에 assay mixture(100 mM potassium phosphate buffer pH 8.3, 300 mM NaCl, 5 mM hip-puryl-his-leu)를 0.1 mL 가한 후 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액(0.2 unit) 0.1 mL을 가하고 37°C에서 1시간 반응 후 1 N HCl 0.25 mL을 가하여 반응을 정지시켰다. 이때 대조구 실험은 반응을 정지시킨 후 시료를 첨가하였고, blank는 증류수를 사용하였다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL을 가하여 15초 동안 잘 섞어주고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 ethyl acetate 층을 새 tube에 옮긴 후 120°C에서 15분간 완전히 건조시켰다. 이것을 1 mL의 증류수에 녹이고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료는 2회 반복 실험하여 평균값으로 나타내었다.

α-Glucosidase 저해활성 측정

된장 메탄올 추출물(10 mg/mL) 50 µL을 α-glucosidase 효소액(0.3 U/mL) 50 µL, 200 mM potassium phosphate

buffer(pH 7.0) 50 μ L과 혼합하여 37°C에서 15분간 예비배양한 후 3 mM pNPG(*p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside) 100 μ L을 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.1 M Na_2CO_3 750 μ L로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7, 피부섬유아세포주인 HS-68(skin fibroblast), 대장암세포주인 HT-29, 유방암세포주인 MCF-7은 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받았다. 세포는 100 units/mL의 penicillin과 100 μ g/mL streptomycin(GIBCO Inc., Carlsbad, CA, USA), 10%의 fetal bovine serum(FBS, GIBCO Inc.)이 함유된 RPMI 1640 배지와 DMEM(GIBCO Inc.) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 항온기에서 배양하였다.

NO 생성 저해활성 측정

10% FBS가 첨가된 배지에 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/well 밀도로 심어 여러 농도의 시료로 처리한 후 LPS(100 ng/mL)를 가하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 mL와 Griess 시약(1%(w/v) sulfanilamide, 0.1% N-1-naphylethylen diamine in 2.5% phosphoric acid) 100 mL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO_2)를 표준물질로 하여 측정하였다. NO 생성 저해율은 다음 식에 의하여 산출한 후 IC_{50} (NO 생성을 50% 저해하는 농도) 값으로 환산하였다.

$$\text{Inhibition of NO production (\%)} = \left(\frac{\text{Control OD} - \text{Sample OD}}{\text{Control OD}} \right) \times 100$$

세포독성 측정

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 96 well micro plate에 2×10^5 cells/well 밀도로 심고, 18시간 배양 후 여러 농도의 시료와 100 ng/mL의 LPS(Sigma, St Louis, MO, USA)을 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 100 mL의 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 0.4 mg/mL을 넣고 1시간 동안 배양한 후 200 μ L dimethylsulfoxide(DMSO)를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 microplate reader(Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 다음 식에 의하여 산출한 후

TC_{50} (50%의 세포독성을 나타내는 농도) 값으로 환산하였다.

$$\text{Cell toxicity (\%)} = \left(\frac{\text{Control OD} - \text{Sample OD}}{\text{Control OD}} \right) \times 100$$

암세포 증식 저해활성 측정

암세포 증식 저해효과는 MTT assay를 이용하여 측정하였다. HS-68 세포(1.0×10^5 cells/mL) 및 HT-29와 MCF-7 세포(2.5×10^5 cells/mL)를 96 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 분획물을 농도별로 20 μ L 가하였다. 24시간 동안 배양한 다음, MTT 용액(200 μ g/mL)을 첨가하고 4시간 동안 반응시켰다. 여기에 DMSO(Sigma) 150 μ L을 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan을 microplate reader(Bio-tek Instruments Inc.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군과 비교하여 증식 저해활성과 세포독성을 나타내었다.

통계처리

실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타냈으며 Student's *t*-test로 통계학적 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

페놀계 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조를 가지고 있으며, phenolic hydroxyl기가 항산화 등과 같은 생리활성을 나타낸다(14). 제주재래식된장 추출분획물의 총 페놀 함량(Table 1)은 에틸아세이트 분획물이 가장 높았고, 부탄올, 디클로로메탄 분획물 순이었다. 에틸아세이트 분획물 중에서는 JTD1이 305.4 μ g/g로 가장 높았으며, JTD3, JTD2, JTD4가 각각 288.6, 270.6, 201.8 μ g/g이었다. Oh와 Kim(15)은 대두, 증자대두, 청국장, 된장에서의 총 페놀 함량은 각각 50, 43, 58, 285 μ g/g로 된장에서 가장 높았으며, 된장의 숙성기간에 따라 함량이 증가하였다고 보고하였다. 또한 Oh 등(16)은 제주재래식된장에서 isoflavone은 274.87~451.49 mg/kg의 함량을 보고하였다.

DPPH 및 superoxide 유리기 소거능

생체 세포는 정상적인 대사과정에서 생성되는 과산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical(OH^\cdot), superoxide anion radical (O_2^\cdot), singlet oxygen($^1\text{O}_2$) 등이 catalase, superoxide dismutase(SOD)와 같은 효소에 의해 제거되는 항산화 방어체

Table 1. Total phenolic content (μ g/g) of solvent fractions from Jeju traditional *Doenjang*

	MeOH	DCM	EtOAc	BuOH	DW
JTD1	14.1 \pm 0.1	70.2 \pm 0.9	305.4 \pm 0.9	73.1 \pm 0.1	13.9 \pm 0.2
JTD2	11.2 \pm 0.2	47.3 \pm 0.4	270.6 \pm 0.2	63.0 \pm 0.3	10.2 \pm 0.1
JTD3	13.3 \pm 0.0	77.8 \pm 1.3	288.6 \pm 2.2	85.4 \pm 0.5	11.6 \pm 0.1
JTD4	13.5 \pm 0.1	63.0 \pm 1.3	201.8 \pm 1.7	67.8 \pm 0.7	13.4 \pm 0.2

The data expressed as means \pm SD of three determinations.

Table 2. DPPH radical scavenging activity (%) of solvent fractions (1 mg/mL) from Jeju traditional *Doenjang*

	MeOH	DCM	EtOAc	BuOH	DW
JTD1	-	-	59.9±7.4	-	21.9±7.7
JTD2	-	-	42.2±2.4	-	6.7±3.0
JTD3	-	-	43.2±7.5	-	-
JTD4	-	-	37.5±12.5	-	6.9±4.6
BHA	96.1±0.3				

The data expressed as mean±SD of three determinations.
-: not detected.

제에 의해 균형을 유지한다. 그러나 흡연 등 각종 스트레스 요인에 의해 이러한 균형이 깨어질 경우 산화스트레스가 일어나 세포 손상을 일으켜 각종 질병이 유발되는 것으로 알려져 있다(17).

DPPH 자유라디칼 소거능(Table 2)은 80% 메탄올 추출물 및 디클로로메탄과 부탄올 분획물에서는 나타나지 않았으나 에틸아세테이트 분획물(1 mg/mL)에서는 37.5~59.9%의 소거활성을 나타내었는데, 이는 합성 항산화제인 BHA의 96.1%보다는 낮은 소거활성을 나타내었다. JTD1이 59.9%로 가장 높았고, JTD4가 37.5%로 가장 낮았는데, 이는 총 페놀 함량의 차이(Table 1)와 일치하는 것으로 보아 된장 분획물의 항산화 활성은 총 페놀 함량과 관련이 있을 것으로 추정되었다.

Superoxide anion radical 소거활성(Table 3)은 부탄올 분획물(1,000 µg/mL)에서 56.3~85.1%로 가장 높았고, 에틸아세테이트 분획물(100 µg/mL)이 47.7~79.2%, 물 분획물(1,000 µg/mL)이 45.1~57.5%를 나타내었고, 메탄올 추출물과 디클로로메탄 분획물은 소거활성을 나타내지 않았다. 특히 JTD1(81.7%)과 JTD4(85.1%)의 부탄올 분획물의 소거활성은 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 소거활성(82.2%)과 유사하였다. 또한 superoxide anion radical 소거활성이 가장 높은 부탄올 분획물에 대하여 농도에 따른 소거활성을 측정된 결과(Fig. 2) 모든 시료에서 분획물의 농도가 증가함에 따라 소거활성이 직선적으로 증가함을 알 수 있었다.

제주 재래식된장의 항산화 활성은 각 제조업체에 따라 차이가 있었는데, Park 등(18)에 의하면 제주도내 콩류 및 재래된장의 isoflavones 함량을 분석한 결과 콩은 재배된 지역에 따라, 된장은 제조업체에 따라 차이를 보고한 바 있으며, 또한 된장의 항산화활성은 발효숙성과정에서 생성된 페놀성

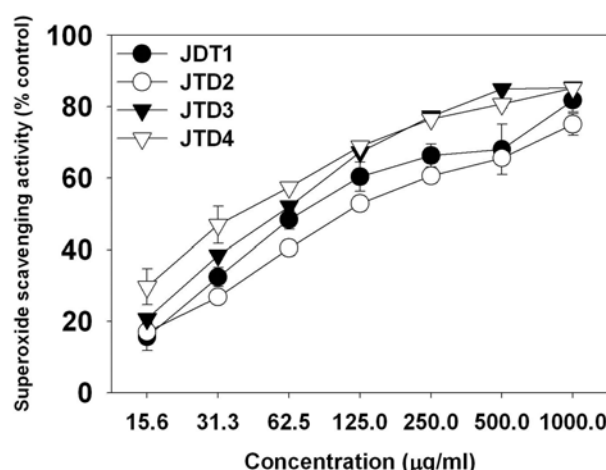


Fig. 2. Superoxide anion scavenging activity of buthanol fractions from Jeju traditional *Doenjang*. The data represent the mean±SD of three determinations.

화합물과 갈변물질이 영향을 미치는 것으로 추정하였다. Jang 등(19)도 메주와 된장의 발효기간 동안 total isoflavone 성분 변화는 glycosides가 줄어들고 daidzein과 genistein이 증가한다고 보고하였는데, genistein은 피부에서 항산화 효과와 항암 효과가 있으며(20), 인체 각질형성 세포주인 NCTC 2544에 genistein을 처리한 결과 자외선에 의해 유도되는 activator protein-1(AP-1)의 결합을 억제하여 지질과산화를 억제하고 활성산소 생성을 차단하는 것으로 알려져 있다(21).

ACE 저해활성

Angiotensin-I converting enzyme(ACE)은 불활성인 angiotensin-I의 C 말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin-II로 전환시켜 혈압을 상승시키고 동시에 생체 내에서 혈압강화 작용을 갖는 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로써 고혈압의 원인이 되고 있다(10).

된장은 단백질이 풍부한 콩 발효식품으로서 발효 미생물에 의해 단백질이 peptide로 전환되어 ACE 억제제로 작용할 것으로 예상되는데, 제주 재래식된장의 ACE 저해 활성은 메탄올 추출물에서 JTD2는 74.5%로 가장 높았으며, 그 다음으로 JTD1이 46.2%를 나타내었다(Table 4).

ACE를 저해하는 peptide는 단일보다는 2~3개의 peptide로 혈중에 존재할 때 빠르게 흡수되어 혈압강화 효과를 나타

Table 3. Superoxide anion scavenging activity (%) of solvent fractions from Jeju traditional *Doenjang*

	MeOH	DCM	EtOAc (at 100 µg/mL)	BuOH (at 1,000 µg/mL)	DW (at 1,000 µg/mL)
JTD1	-	-	77.1±10.7	81.7±3.2	57.5±1.4
JTD2	-	-	79.2±10.3	75.0±3.0	51.3±1.6
JTD3	-	-	51.6±12.7	56.3±0.7	45.1±4.3
JTD4	-	-	47.7±7.1	85.1±0.2	48.1±3.2
BHA	82.2±2.4				

The data expressed as mean±SD of three determinations.
-: not detected.

Table 4. Inhibitory activity (%) of angiotensin I-converting enzyme (ACE) and α -glucosidase of solvent fractions from Jeju traditional *Doenjang*

	ACE		α -Glucosidase (%)		
	MeOH	MeOH	DCM	BuOH	DW
JTD1	46.2±0.6	44.2±1.4	75.9±0.1	13.5±0.2	7.1±1.6
JTD2	74.5±0.3	33.5±0.8	72.0±0.4	15.6±1.0	5.5±1.3
JTD3	23.6±0.2	43.1±0.5	80.2±0.3	12.2±0.9	7.3±1.3
JTD4	25.6±0.2	44.3±0.9	74.9±0.1	22.6±1.1	8.6±0.9
Acarbos	—		57.4±6.6		

The data expressed as mean±SD of three determinations.

낸다고 알려져 있는데, Kuba 등(10)에 의하면 Ile-Phe-Leu와 Trp-Leu가 콩 발효식품인 tofuyo에서 분리되었으며, 혈중에 쉽게 흡수되어 항고혈압 효과를 나타낸다고 보고하였다. 또한 Pyo와 Lee(22)에 의하면 *Monascus*에 의해 발효된 콩의 물 추출물에서 65%의 ACE 저해활성을 나타내었으며, 콩 추출물의 ACE 저해활성은 항산화능과 관련이 있는 것으로 밝혀진 바 있는데, 제주 재래식된장 메탄올 추출물인 경우 항산화 활성은 미약하였으나 ACE 저해활성은 23.6~74.5%인 것으로 보아, 제주 재래식된장에서 항산화능과 ACE 저해효과와의 연관이 미약한 것으로 추정된다.

α -Glucosidase 저해활성

α -Glucosidase는 소장 점막에 존재하는 효소로서 탄수화물식이 후 단당류 생성에 관여하므로, α -glucosidase의 활성을 저해함으로써 혈당 상승을 억제할 수 있어 항당뇨 활성 측정법으로 이용되고 있다(23). 제주 재래식된장의 α -glucosidase 저해활성(Table 4)은 디클로로메탄 분획물에서

72.0~80.2%로 가장 높았고, 그 다음으로 메탄올 추출물에서 33.5~44.3%를 나타내었는데, 메탄올 추출물은 양성 대조군으로 사용한 acarbos의 57.4%와 비교하여 볼 때 높은 활성을 나타내었다. 평소 기능성식품의 섭취에 의하여 성인병을 예방하거나 지연시킬 수 있다고 알려지고 있는데(24), 제주 재래식된장의 섭취는 당뇨병을 비롯한 성인병을 예방하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 추정된다. Lee와 Lee(25)도 콩의 isoflavone인 genistein은 α -glucosidase 저해능을 가지며 대사 장애에 유용하게 사용될 가능성이 있음을 보고하였다.

NO 생성 저해활성

RAW 264.7 세포를 이용하여 항산화 활성이 가장 높은 에틸아세테이트 분획물의 NO 생성 저해활성과 세포독성을 측정하였다. 에틸아세테이트 분획물을 농도별(6.25~100 μ g/mL)로 처리한 실험군에서 NO 생성량은 처리 농도에 비례하여 현저히 감소하였다(Fig. 3). IC₅₀값은 JTD1, JTD2,

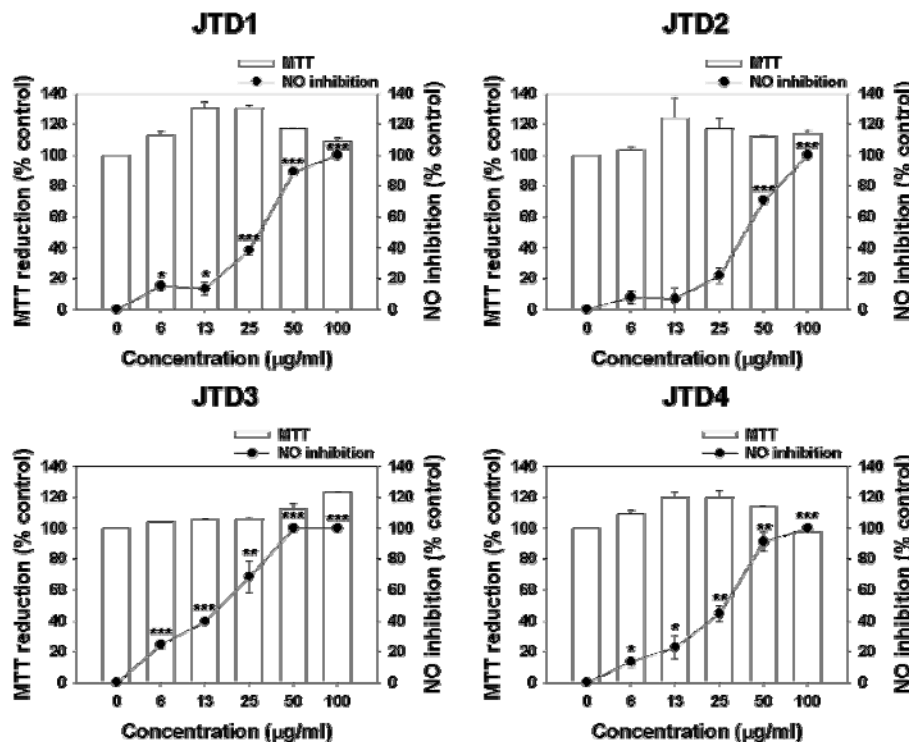


Fig. 3. Effect of ethyl acetate fraction on inhibition activity of NO production against LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The data represent the mean±SD of three determinations. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs LPS-activated group without sample.

Table 5. Cell toxicity and inhibitory activity of ethyl acetate fraction from Jeju traditional *Doenjang* on LPS-induced NO production against RAW 264.7 cells

	IC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	TC ₅₀ ²⁾ (µg/mL)	Selectivity index ³⁾
JTD1	29.0±3.0	>100	3.44
JTD2	38.8±3.0	>100	2.57
JTD3	17.3±2.4	>100	5.75
JTD4	26.6±2.2	>100	3.74

¹⁾IC₅₀ is the concentration producing 50% inhibition of NO production against RAW 264.7 cells.

²⁾TC₅₀ is the concentration producing 50% toxicity against RAW 264.7 cells.

³⁾Selectivity Index=TC₅₀/ IC₅₀.

The data expressed as means±SD of three determinations.

JTD3, JTD4가 각각 29.0, 38.8, 17.3, 26.6 µg/mL로 JTD3의 NO 생성 저해활성이 가장 높았지만, 세포독성은 모든 분획물에서 관찰되지 않았다(Table 5).

RAW 264.7 세포에서의 NO 생성은 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현과도 밀접하게 관련되어 있는데, COX-2에 의해 만들어지는 prostaglandin E₂는 염증반응을 유발하고, 유방암, 결장암, 폐암, 뇌종양 등에 관여하는 것으로 보고되었다(26). 따라서 암의 발현과 관련이 있는 HT-29와 MCF-7에 대한 세포 증식 저해활성을 측정하였다.

암세포 증식 저해활성

제주 재래식된장 용매분획물의 세포증식 저해활성(Fig. 4)은 정상세포주인 피부섬유 아세포(HS-68)를 에틸아세테이트 분획물로 처리한 결과 JTD1, JTD2, JTD3은 100 µg/

mL 이하의 농도에서 세포증식 저해활성을 나타내지 않았다. 그러나 JTD4는 50 µg/mL 이하의 농도에서는 세포독성이 없었으나, 100 µg/mL에서는 21%의 세포독성을 나타내었다. 대장암 세포주(HT-29)를 에틸아세테이트 분획물로 처리한 결과 JTD1, JTD2는 세포증식 저해효과가 없었으나, JTD3, JTD4는 100 µg/mL 이상에서는 증식저해 효과를 보였는데, 100 µg/mL에서 JTD4는 20.0%, JTD3은 32.4%의 세포증식 저해효과를 나타내었다. JTD4는 정상세포주로 사용한 피부섬유아세포에서 21%의 세포독성을 나타내었기 때문에 100 µg/mL에서는 대장암세포 특이적인 증식억제는 하지 않은 것으로 사료된다. 유방암 세포주(MCF-7)를 에틸아세테이트 분획물(100 µg/mL)로 처리한 결과 농도 의존적으로 세포증식이 저해되었으며, JTD4는 34.7%, JTD3은 30.9%의 세포증식 저해효과를 보였다. Park(27)에 의하면 된장의 핵산 추출물이 인체 유방암세포(MCF-7)에서 cyclin B1의 생성을 저해하지만, cyclins와 cyclin-dependent kinases 생성에는 영향을 미치지 않고 G2 phase에서 M phase로의 단계를 차단시킴으로써 항암효과를 나타낸다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 항암효과를 세포주기 수준에서 분석하지 못하였는데, 앞으로 이에 대한 세심한 연구가 필요하다.

Lim 등(28)은 원료 콩과 된장의 80% 메탄올 추출물로 암세포 성장 저해 활성을 측정한 결과 콩보다는 된장에서 DNA 합성이 저하되었는데, 이는 콩이 발효되는 동안 생성되는 물질인 aglycones, linoleic acid, protease inhibitor,

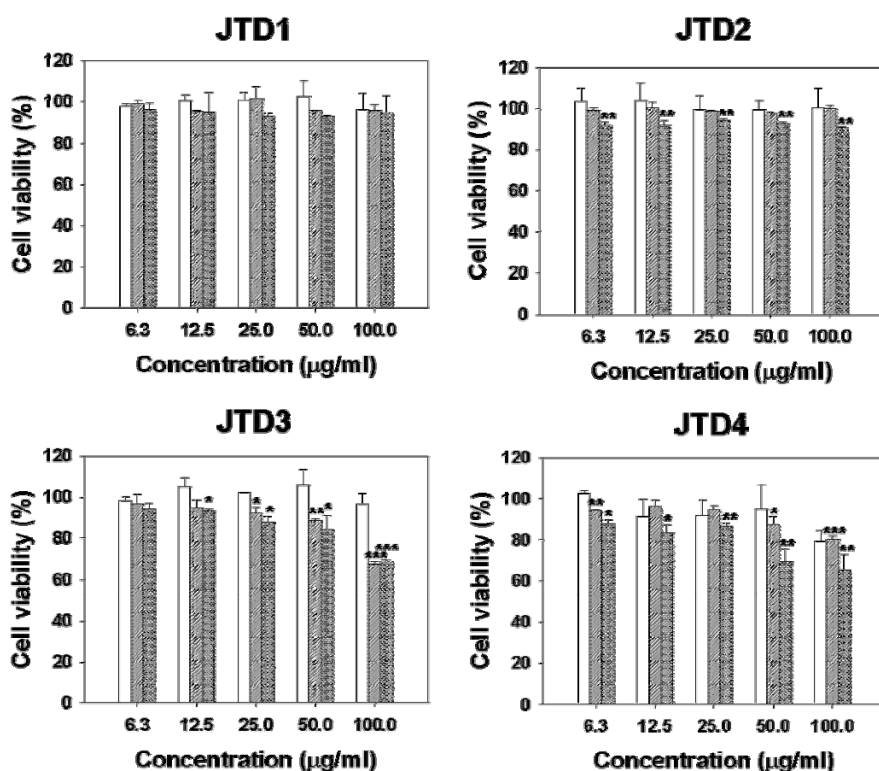


Fig. 4. Inhibitory activity of cell growth of ethyl acetate fraction from *Doenjang* against HS-68, HT-29, and MCF-7 cells. □: HS-68 human genital skin fibroblast cell line, ▨: HT-29 human colon adenocarcinoma grade II cell line, ▩: MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. The data represent the mean±SD of three determinations. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs control group without sample treatment.

genistein 등에 의한 가능성을 시사한다. Kurechi 등(29)은 일본 된장이 nitrite의 생성을 저해함으로써 발암물질인 N-nitrosamine 생성을 억제하여 위암 발생을 감소시켜 준다고 보고하였다. Hwang 등(30)은 된장의 발효기간에 따른 ACS 위암 세포주의 세포성장 저해율은 12개월보다 24개월 발효시킨 된장이 높았는데, 이는 Bax의 발현은 증가하였고, Bcl-2의 발현은 저해되었기 때문이라고 보고하였다.

본 연구에서 제주 재래식된장을 80% 메탄올로 추출하고, 각 용매별로 분획 추출한 결과, 에틸아세테이트 분획물에서 폴리페놀 함량이 가장 높았고, 항산화 효과 및 암세포 증식 저해활성 또한 가장 높았다. 따라서 이 분획물에서 지표물질을 분리, 정제하여 암세포 증식저해 작용기전을 밝혀내는 연구가 더욱 진행된다면, 제주 재래식된장의 생리적 특성을 밝히는데 많은 도움이 되어 제주 재래식된장의 과학화에 기초를 다질 수 있을 것이다.

요 약

제주재래식된장의 생리적 특성을 측정하기 위하여 제주 도내 전통된장업체로부터 된장제품 4종(JTD1-4)을 수거하여, 유기용매로 추출, 분획하여 총 페놀 함량, 항산화활성(DPPH 유리기 소거능, superoxide 유리기 소거능), ACE 및 α -glucosidase 저해능, 항염 및 항암효과를 측정하였다. 에틸아세테이트 분획물에서 총 페놀 함량(201.8~305.4 $\mu\text{g/g}$)과 DPPH 유리기 소거활성(37.5~59.9%)이 가장 높았다. Superoxide anion radical 소거활성은 부탄올 분획물에서 56.3~85.1%로 가장 높았는데, JTD1(81.7%)과 JTD4(85.1%)의 소거활성은 양성대조구로 사용한 ascorbic acid의 소거활성(82.2%)과 유사하였다. ACE 저해활성은 메탄올 추출물에서 23.6~74.5%로 가장 높았다. α -Glucosidase 저해활성은 디클로로메탄 분획물에서 72.0~80.2%로 양성대조구인 acarbo의 57.4%보다 높았다. RAW 264.7 세포를 대상으로 한 NO 생성 저해활성(IC₅₀: 17.3~29.0 $\mu\text{g/mL}$)은 에틸아세테이트 분획물이 가장 높았지만, 세포독성은 모든 분획물에서 관찰되지 않았다. 에틸아세테이트 분획물의 세포증식 저해활성은 정상세포주인 피부섬유아세포(HS-68)에서 JTD1-3은 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 나타내지 않았으나, JTD4는 21%의 세포독성을 나타내었다. 대장암 세포주(HT-29)에 대해서는 JTD1과 JTD2는 세포증식이 저해되지 않았으나, JTD3과 JTD4는 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 증식저해 효과를 나타내었다. 유방암 세포주(MCF-7)는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 JTD3은 30.9%, JTD4는 34.7%의 세포증식 저해효과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 제주특별자치도 제주형 발효식품산업육성 클러스터사업을 제주대학교 생명과학기술혁신센터

(제주대 RIC)에서 수행한 연구결과로, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Deby C. 1988. Metabolism of polyunsaturated fatty acids, precursors of eicosanoids. In *Prostaglandins: Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids*. Curtis-Prior PB, ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. p 11-36.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Chang TS, Ding HY, Tai SSK, Wu CY. 2007. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein fungi used in the preparation of various fermented soybean foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1330-1333.
- Choi SB, Park SM. 1999. The effect of ϵ -6 polyunsaturated fat and vitamin E intakes on insulin resistance in 90% pan-creatomized rats. *Korean J Med* 55: 489-499.
- Kim MH, Im SS, Kim SH, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic Meju and Doenjang 2. separation of lipophilic brown pigment and their anti-oxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 251-260.
- Yang MS, Nam SH. 1995. Isolation of cytotoxic substances from *Chrysanthemum boreale* M. *Agric Chem Biotechnol* 38: 273-277.
- Korea National Statistical Office. 2008. The cause of death statistics 2007. Annual Report on the Cause of Death Statistics. p 21.
- Kim HB, Lee HS, Kim SJ, Yoo HJ, Hwang JS, Chen G, Youn HJ. 2007. Ethanol extract of fermented soybean, *Chungkookjang*, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J Microbiol* 35: 256-261.
- Kuba M, Tanaka K, Tawata S, Takeda Y, Yasuda M. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1278-1283.
- Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis AD, Barrow CJ. 2006. Barrow A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J Appl Phycol* 18: 445-450.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200.
- Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 60: 763-771.
- Lee JH, Min DB. 2006. Nutraceuticals, aging, and food oxidation. *Handbook of Functional Lipids*. Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, USA. p 325-350.
- Oh HJ, Kim CS. 2007. Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (*Chungkukjang*, *Doenjang*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1503-1510.
- Oh HJ, Lim JH, Lee JY, Jeon BS, Kang HY, Oh YS, Oh YJ, Lim SB. 2009. Quality characteristics of jeju traditional *Doenjang*. *Kor J Culinary Res* 15: 298-308.
- Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS. 2004. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Thrombo Haemost* 3: 254-267.
- Park JS, Park HY, Kim DH, Kim DH, Kim HK. 2008.

- Ortho-dihydroxyisoflavone derivatives from aged *Doenjang* (Korean fermented soypaste) and its radical scavenging activity. *Bioorg Med Chem Lett* 18: 5006-5009.
19. Jang CH, Park CS, Lim JK, Kim JH, Kwon DY, Kim YS, Shin DH, Kim JS. 2008. Metabolism of isoflavone derivatives during manufacturing of traditional *Meju* and *Doenjang*. *Food Sci Biotechnol* 17: 442-445.
 20. Afaq F, Ukhtar H. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol* 15: 678-684.
 21. Mazire C, Dantin F, Dubois F, Santus R, Mazire J. 2001. Biphasic effect of UVA radiation on STAT1 activity and tyrosine phosphorylation in cultured human keratinocyte. *Free Radic Biol Med* 28: 1430-1437.
 22. Pyo YH, Lee TC. 2007. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus*-fermented soybean extracts: evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives. *J Food Sci* 72: 218-223.
 23. Kim SB, Lee TG, Park YB, Yeum DM, Kim OK, Do JR, Park YH. 1994. Isolation and characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of peptic hydrolyzates of anchovy muscle protein. *Bull Korean Fish Soc* 27: 1-6.
 24. Kim DS, Kwon HJ, Jang HD, Kwon YI. 2009. *In vitro* α -glucosidase inhibitory potential and antioxidant activity of selected *Imiaceae* species inhabited in Korean peninsula. *Food Sci Biotechnol* 18: 239-244.
 25. Lee DS, Lee SH. 2001. Genisten, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. *FEBS* 501: 84-86.
 26. Salvemini D, Manning PT, Zweifel BS. 1995. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the anti inflammatory properties of nitric oxide synthetase inhibitors. *J Clin Invest* 96: 301-308.
 27. Park KY. 1997. Destruction of alfatoxins during the manufacture of *Doenjang* by traditional method and cancer preventive effects of *Doenjang*. *J Korean Assoc Cancer Prev* 2: 27-37.
 28. 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.
 29. Kurechi T, Kikugawa K, Fukuda S, Hasunuma M. 1981. Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Food Cosmet Toxicol* 19: 425-428.
 30. Hwang KM, Lee JM, Park KY. 2005. *Doenjang* extracts has anticancer activity and induces apoptosis in AGS human gastric adenocarcinoma. *J Food Sci Nutr* 10: 167-171.

(2009년 9월 7일 접수; 2009년 10월 22일 채택)