

발아와 고압처리가 검정콩 사포닌 추출물의 암세포주 증식억제에 미치는 영향

김민영 · 이윤정 · 송명섭* · 오현아* · 김경미** · 강태수*** · 이연리**** · 이준수**** · 정현상****

충북대학교 식품생명공학과 박사후연구원, *충북대학교 식품생명공학과 대학원생,
농촌진흥청 국립농업과학원 농업연구사, *충북도립대학교 바이오식품과학과 교수,
****대전보건대학교 식품영양학과 조교수, *****충북대학교 식품생명공학과 교수

Influence of High Hydrostatic Pressure Treatment after Germination on Anti-proliferation Effects of Soyasaponin-rich Fraction in Black Soybean (*Glycine max* L.)

Min Young Kim, Yoon Jeong Lee, Myeong Seob Song*, Hyunah Oh*, Kyung Mi Kim**,
Tae Su Kang***, Youn Ri Lee****, Junsoo Lee**** and †Heon Sang Jeong*****

Ph. D., Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

*Master's Student, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

**Researcher, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea

***Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial University of Science and Technology, Okcheon 29046, Korea

****Assistant Professor, Dept. of Food and Nutrition, Daejeon Health Sciences College, Daejeon 300-711, Korea

*****Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Abstract

The objective of this study was to determine the effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatment on proliferation of human cancer cell lines (MCF-7, HCT-116, PC-3 and AGS) of crude soyasaponin extracts in germinated black soybean. Black soybean was germinated and subjected to HHP, followed by preparation of crude soyasaponin extracts. Cell treatments done with extracts less than 400 µg/mL concentrations had no significant effect on 3T3-L1 adipocyte cell viability. The inhibitory effect of crude soyasaponin extracts with germination periods and applied pressure on breast cancer cell (MCF-7), human colon cancer cell (HCT-116), human gastric cancer cell (AGS) and prostate cancer cell (PC-3) growth were investigated using MTT assay. The highest anti-proliferation of human cancer cell line of crude soyasaponin extracts was observed at 150 MPa treatment after germination for 4 days (150 MPa-Day 4). The cell viability on MCF-7, HCT-116, PC-3 and AGS cell lines of crude soyasaponin extract in 150 MPa-Day4 was 48.82%, 57.37%, 39.89% and 23.94% at 400 µg/mL, respectively. These results suggest that soyasaponin extracts from black soybean subjected to HHP after germination may mediate physiological activity.

Key words: black soybean, soyasaponin, germination, high hydrostatic pressure treatment, anticancer activity

서 론

검정콩(*Glycine max* (L.) Merr.)은 각종 성인병의 원인이 되는 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추고, 동맥경화, 뇌졸중 및 고

혈압 등의 예방과 당뇨병, 간장병에 탁월한 효과를 나타내어 영양학적 가치와 기능성 식품 소재로서의 중요성도 인정되고 있다(Liu 등 2017; Kim 등 2008). 검정콩의 생리활성은 페놀 화합물, 아이소플라본, 사포닌 및 안토시아닌과 같은 다양한

† Corresponding author: Heon Sang Jeong, Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea. Tel: +82-43-261-2570, Fax: +82-43-271-4412, E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr

phytochemical에 의한 것으로 알려져 있으며(Ryoo 등 2004; Astadi 등 2009), 그 중 soyasaponin은 oleanane계 triterpenoid 화합물로 주로 두과에 고루 분포하고 있다(Ireland 등 1986). Soyasaponin들은 개별 aglycone들의 구조에 따라 A그룹과 B 그룹으로 분류하며(Shiraiwa 등 1991), aglycone과 배당체의 종류에 따라 항산화 활성(Ishii & Tanizawa 2006), 콜레스테롤 저하 효과(Lee 등 2005), 항염 활성(Lee 등 2010) 및 항암 활성(Kerwin SM 2004) 등의 생리활성이 다양하게 분포한다고 알려져 있다.

콩을 비롯한 종자는 씨눈과 배젖에 있는 각종 효소 및 영양소 등이 외적 환경 여건이 좋아지면 활성화 되어 발아되는데, 일반적으로 발아가 진행됨에 따라 다양한 성분들이 증가되고, 그에 따라 생리활성이 증가되는 경향이 있는 것으로 알려져 있다(Lee 등 2007). 따라서 조, 기장(Ko 등 2011), 메밀(Lee & Kim 2008), 들깨(Chung & Kim 1998), 대두(Kim 등 2004) 등으로 다양한 종자에 대한 발아에 따른 유용성분 및 생리활성의 변화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

고압처리기술은 구조적으로 유연한 식물체 내의 세포 변형, 세포막 손상, 단백질 변성과 같은 변화를 발생시키기 때문에 화학성분 및 유용성분의 용출성 및 용해성을 향상시킬 수 있으며(San Martin 등 2002; Kim CT 2009), 100 MPa 이하의 압력에서는 기질의 변성, 효소구조의 안정화 및 효소와 기질의 결합력 향상 등에 따라 효소반응속도가 달라지므로 고압처리에 의한 가수분해효율을 증가시키려는 연구가 다양하게 진행되고 있다(Northrop DB 2002).

이와 같이 발아를 통해 다양한 종자의 유용성분 및 생리활성을 증대시키는 연구와 가수분해효소의 활성을 증가시키기 위하여 고압처리공정이 이용되고 있지만, 검정콩으로부터 생리활성을 나타내는 사포닌을 생성하기 위한 발아 및 고압의 병행처리기술의 적용에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 검정콩을 발아시킨 후 0.1~150 MPa의 압력 하에서 24시간동안 고압처리를 실시하여 발아일수와 처리압력에 따른 조사포닌 추출물의 암세포주 억제활성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 발아

본 실험에 사용된 청자 3호는 2015년도에 생산된 콩을 농촌진흥청에서 분양받아 사용하였다. 발아는 Lopez 등(2013)의 방법에 따라 콩을 20℃의 증류수로 수세하고, 5배의 증류수를 가수하여 24시간동안 침지시킨 다음 발아기(WGC 450, Dahan Inc, Seoul, Korea)로 발아시켰다. 발아온도는 25℃, 습도는 90%를 유지시키면서 발아시켰으며, 1일 3회씩 10

분간 물주기를 하면서 발아시켰다. 발아기간은 2일 및 6일로 하였고, 발아시키지 않은 콩을 대조구로 하였다. 콩 및 발아 콩은 동결건조기(Freeze dryer, FD5508, Ilshin Lab Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에서 건조시킨 다음 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

2. 고압처리

가압은 정수압 압력처리 시스템(WIP-L60-50-200, Ilshin Autoclave Co., Daejeon, Korea)을 이용하였으며, 압력용기 내부의 온도는 발아조건과 동일한 37℃에서 유지되도록 하였다. 0, 2 및 4일간 발아시킨 콩을 수분과 산소투과성이 적은 알루미늄 호일필름(Newpack, Seoul, Korea)에 10 g 단위로 진공포장한 후 0.1, 50, 100 및 150 MPa의 압력 하에서 24시간 동안 처리하였으며, 압력처리는 효소가 불활성화 되지 않도록 발아 콩 시료 제작 직후에 실시하였다. 발아콩 및 고압처리를 실시한 콩은 동결건조하고 냉동보관하여 시료로 사용하였다.

3. 조사포닌 추출물 제조

검정콩의 조사포닌 추출물은 Berhow(2002)의 방법을 변형하여 제조하였다. 조사포닌을 추출하기 전에 처리조건별 시료는 hammer mill을 사용하여 100 mesh로 분쇄하였으며, 25℃의 shaking incubator(JSSB 30-T, JSR, Seoul, Korea)에서 1시간 동안 hexane을 이용하여 3회 진탕 탈지하여 시료로서 사용하였다. 처리조건 별 탈지시료는 각각 시료 중량대비 10배량 80% 에탄올(v/v)을 첨가하여 1시간 동안 3회 반복하여 초음파 추출하고, 이 추출물을 감압 여과한 후 농축한 뒤 수포화 부탄올을 이용하여 조사포닌을 분리 용출하였다. 분리 용출하여 얻어진 사포닌은 농축하여 동결 건조한 다음 조사포닌을 추출 정량하였으며, -20℃에서 보관하면서 생리활성 측정용 시료로 사용하였다.

4. 암세포주 배양

본 실험에서 사용한 암세포는 MCF-7(breast cancer cell), HCT-116(colon cancer cell), PC-3(prostate cancer cell) 및 AGS(gastric cancer cell)를 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 U/mL penicillin G, 50 µg/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지(Gibco Co., New York, USA)와 DMEM(Gibco Co.)을 사용하여 5% CO₂, 37℃ 배양기(EYELA, Vision scientific Co., Daejeon, Korea)에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5분간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을 실시하였다.

5. 세포독성 측정

조사포닌 추출물의 세포독성은 일반세포인 3T3-L1 cell

을 이용하여 Ishiyama 등(1996)의 방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 cell은 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 U/mL penicillin G, 50 µg/mL streptomycin을 첨가한 DMEM (Gibco Co.)을 사용하여 5% CO₂, 37°C 배양기(EYELA, Vision scientific Co., Daejeon, Korea)에서 배양하였다. 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 µL씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 일정농도가 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였으며, 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정농도로 희석된 시료를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well 당 10 µL씩 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO 100 µL를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader(ELx 808, Bio-Tek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 세포독성은 세포생존률로 표시하였고, 3T3-L1 cell에서 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 암세포주 성장억제 효과를 측정하였다.

6. 암세포주 성장억제 효과 측정

조사포닌 추출물의 암세포 성장억제 효과를 측정하기 위해 Ishiyama 등(1996)의 방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay로 측정하였다. 즉, 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 µL씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정농도로 희석된 물 및 70% 에탄올 추출물 100 µL를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT 시약을 well 당 10 µL씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 후 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 µL를 가한 후 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader (ELx808, Bio-tek[®] Inc., Winooski, VT, USA)를 이용, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 암세포증식 억제율은 생존율로 표시하였다.

7. 통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고, 처리조건 간의 차이 유무를 one-way ANOVA(analysis of variance)로 분석한 뒤 신뢰구간 $p < 0.05$ 에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 조사포닌 함량 및 세포독성

발아기간 및 처리압력에 따른 검정콩 조사포닌의 함량은 Table 1과 같이 발아 및 고압처리에 의해 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 고압처리를 하지 않은 대조구는 발아 전 조사포닌 함량이 39.36 mg/g 이었지만, 발아 4일차에는 50.76 mg/g로 증가하였다. 이는 콩나물이 발아 및 성장하면서 발아 6일까지 콩의 조사포닌 함량이 증가한다는 Oh 등(2003)의 연구와 유사하였다. 또한, 4일차 발아콩의 조사포닌 함량에 미치는 고압처리의 효과는 처리압력에 따라 다양하게 나타났다. 즉, 처리압력이 증가함에 따라 조사포닌 함량은 50.76~57.85 mg/g의 범위로 100 MPa까지 증가하다가 150 MPa 처리 시 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 발아와 가압처리를 병행하였을 때 세포벽 가수분해효소의 활성이 증가하고, 그에 따라 추출 시 조사포닌의 용출이 용이해진 것으로 판단된다(Northrop DB 2002).

암세포주의 성장억제 효과 평가 전 MTT assay를 이용하여 3T3-L1 세포에서 고압처리 발아콩으로부터 추출한 조사포닌의 세포독성을 확인하였다(Table 1). 추출물을 농도별(50, 100, 200, 400, 1,000 µg/mL)로 처리한 결과, 1,000 µg/mL를 제외한 모든 농도에서 90% 이상의 생존율을 보여 인체유래 유방암(MCF-7), 대장암(HCT-116), 전립선암(PC-3) 및 위암(AGS) 세포주에 대한 항암 활성 평가는 독성을 보이지 않은 400 µg/mL 이하의 농도에서 진행하였다.

2. 유방암세포(MCF-7) 성장억제효과

발아기간 및 처리압력에 따른 검정콩 조사포닌 추출물이 인체유래 유방암세포주(MCF-7) 성장억제에 미치는 영향을 측정된 결과, Table 2와 같이 유의적인 차이를 나타내었다. 400 µg/mL 농도에서 암세포 성장억제 효과를 살펴보면 고압처리를 하지 않은 대조구는 발아 전 83.10%였지만, 발아 2일 및 4일차에는 각각 72.20% 및 75.14%의 세포생존율을 보여 발아에 따라 조사포닌 추출물의 유방암세포주(MCF-7)에 대한 증식억제 효과가 증가하였다. 또한, 4일차 발아콩의 유방암세포주(MCF-7) 성장억제에 미치는 고압처리의 효과는 처리압력에 따라 다양하게 나타났다. 즉, 처리압력이 증가함에 따라 유방암세포주(MCF-7)의 생존율은 75.14~48.82%의 범위로 150 MPa까지 지속적으로 감소하여 150 MPa 처리구의 고압처리발아콩이 가장 높은 항암 활성을 나타내었다. 콩으로부터 추출한 조사포닌, B group의 soyasaponin 및 soyasapogenol의 항암 활성은 자궁경부선암세포(Hela cell), 대장암세포(HCT-15), 간암세포(Hep-G2) 및 유방암세포(MCF-7) 등 다양한 인체유래 암세포의 증식억제, 형태학적 변화 및 Apoptosis

Table 1. Changes in crude soyasaponin contents and cell viability for raw 264.7 and 3T3-L1 cell of crude saponin extracts with germination and high hydrostatic pressure treatment (50, 100 and 150 MPa for 24 h) in black soybean

Pressure (MPa)	Germination periods (days)	Crude soyasaponin contents (mg/g)	Cell viability of 3T3-L1 cell (%)				
			50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	1,000 µg/mL
Con	0	39.36±1.27 ^{Cc}	107.20±4.32	109.17±5.61	107.67±9.35	107.58±8.95	97.1±4.37
	2	40.02±0.69 ^{Db}	114.03±1.15	118.05±6.50	108.89±8.03	106.55±3.09	80.12±3.61
	4	50.76±1.22 ^{Da}	118.24±4.07	114.31±5.10	117.31±1.01	105.24±6.00	53.74±3.24
0.1	0	37.28±1.75 ^{Bc}	95.30±0.62	108.42±3.38	104.02±5.85	101.31±6.83	93.45±2.93
	2	37.59±1.12 ^{Eb}	95.41±5.65	110.94±2.55	111.13±5.20	101.03±1.84	83.91±6.88
	4	47.06±1.56 ^{Ca}	94.01±1.83	114.31±3.19	110.94±3.35	95.23±9.28	52.39±8.25
50	0	41.82±1.25 ^{Bc}	102.81±4.31	109.07±3.89	109.82±9.92	101.03±9.31	99.91±7.54
	2	44.47±2.01 ^{Bb}	103.60±5.07	104.95±3.42	106.17±6.74	97.75±8.24	98.13±8.34
	4	52.85±1.00 ^{Ba}	112.72±8.05	111.60±3.39	113.66±0.28	105.99±1.87	68.05±1.26
100	0	44.63±1.25 ^{Ac}	122.86±7.42	118.20±1.98	113.63±2.87	102.63±2.64	96.9±2.94
	2	48.03±2.25 ^{Ab}	127.24±14.27	116.43±7.63	105.43±2.06	108.79±1.68	60.41±6.71
	4	57.85±0.88 ^{Aa}	102.45±2.93	107.30±9.50	94.52±1.94	96.67±1.23	28.52±0.28
150	0	44.01±2.05 ^{Aa}	101.70±3.98	108.79±5.34	102.54±4.39	96.57±8.88	84.18±5.87
	2	42.40±4.37 ^{Ca}	106.74±2.87	106.74±4.89	101.70±6.17	98.16±10.67	68.66±1.05
	4	43.54±5.12 ^{Ea}	111.21±5.94	113.82±10.39	105.71±6.33	98.72±5.33	21.39±1.26

Values are mean±S.D. of 3 replicates. Different capital letters in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among different pressure (0.1~150 MPa). Different small letters in the same items indicate a significant difference ($p<0.05$) among different germination periods of black soybean.

Table 2. Anti-proliferative effects of crude saponin extracts of black soybean treated by different high hydrostatic pressure treatments (0.1~150 MPa) and germination (0~4 days) in MCF-7 breast cancer cell

Pressure (MPa)	Germination periods (days)	Cell viability of MCF-7 breast cancer cell (%)				
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Con	0	101.60±3.68	96.84±6.23	87.79±3.17	87.22±6.18	83.10±5.24
	2	92.15±3.61	96.41±5.91	84.43±6.95	81.25±1.37	72.20±2.35
	4	100.39±2.08	101.07±2.28	82.72±3.56	84.90±3.15	75.14±5.37
0.1	0	100.44±0.72	91.44±3.92	86.37±0.73	86.23±1.53	83.57±1.99
	2	90.54±3.14	88.60±1.51	81.49±3.79	71.82±1.21	70.69±0.72
	4	100.11±0.97	97.08±5.71	77.32±4.41	72.58±4.40	66.99±2.13
50	0	100.63±0.61	98.11±6.07	75.57±4.10	74.15±1.62	74.53±0.64
	2	99.87±0.22	98.83±3.79	84.62±8.82	76.70±4.36	68.18±0.97
	4	100.54±2.61	94.19±4.14	80.49±8.10	78.41±1.10	70.59±2.56
100	0	97.65±3.91	92.48±6.81	84.24±9.21	75.28±3.99	68.44±6.98
	2	96.84±2.01	99.54±1.29	80.83±4.61	72.68±2.10	55.36±3.98
	4	93.90±2.13	91.25±1.64	71.40±4.89	70.26±4.47	51.74±9.51
150	0	93.19±3.41	86.75±4.84	89.21±4.53	77.98±1.13	69.50±6.61
	2	95.51±4.03	83.05±2.80	68.32±3.01	70.02±1.13	59.91±4.89
	4	95.75±5.33	74.76±3.96	70.92±5.59	60.55±6.85	48.82±6.73

유발한다는 연구가 다수 진행되었다(Xiao 등 2007; Ellington 등 2005; Kinjo 등 2003). 그 중에서도 대두의 식용사포닌을

유방암세포주에 1,000 µg/mL 농도로 처리하였을 때 40% 이하의 생존율을 나타내었다는 Park 등(2005)의 연구 및 콩나물

이 발아 및 성장하면서 조사포닌 함량이 5~6일째 5.30~5.33 mg/g으로 가장 높은 함량을 보인다는 Oh 등(2003)의 연구결과로 미루어 볼 때, 본 연구에서 유방암세포주(MCF-7)에 대한 증식억제 효과가 증가한 것은 발아기간 및 처리압력이 증가함에 따라 항암 활성을 나타내는 Soyasaponin 함량이 증가함에 따른 결과로 판단된다.

3. 대장암세포(HCT-116) 성장억제효과

인체유래 대장암세포주(HCT-116) 성장억제에 미치는 고압처리 발아콩 조사포닌 추출물의 영향을 살펴본 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 저농도인 25~100 µg/mL의 경우, 모든 처리구에서 100.33~95.37%의 세포생존율을 보여 유방암 및 위암세포주에 비해 성장억제효과가 거의 없는 것으로 나타났지만, 400 µg/mL에서는 발아기간 및 처리압력이 증가함에 따라 대장암세포주(HCT-116)에 대한 세포생존율이 80.37~57.37% 범위로 감소하여 발아 4일차 콩을 150 MPa에서 고압처리하였을 때 가장 높은 항암 활성을 나타내었다. 고농도의 Soyasaponin 추출물의 인체유래 대장암 세포(HCT-15)의 증식을 억제한다고 보고된 바 있으며(Ellington 등 2005), Ellington 등(2005)의 연구에 따르면 대두로부터 분리한 Soyasaponin B group은 대장암세포의 autophagy와 apoptosis를 동시에 유도함으로써 HCT-15 대장암세포의 증식억제 효과를 나타내었다고 하였다. Shimoyamada & Okubo (1991)은 발아콩의 경우,

대조구에 비해 Soyasaponin A group은 2.3배 감소하는 반면, Soyasaponin B group은 2.5배 증가하며, 이는 발아가 진행됨에 따른 soyasapogenol glucuronosyltransferase(UGASGT)의 활성화에 의한 Soyasaponin B group의 생합성 증가에 따른 결과라고 하였는데, 본 연구에서도 발아 및 고압처리에 따라 Soyasaponin B group의 함량이 증가하고 그로 인하여 대장암세포주(HCT-116)에 대한 항암 활성이 증가된 것으로 판단된다.

4. 전립선암세포(PC-3) 성장억제효과

발아와 고압처리가 검정콩 사포닌 추출물의 인체유래 전립선암세포주(PC-3) 증식억제에 미치는 영향을 살펴본 결과, Table 4와 같이 처리조건 및 농도에 따라 다양하게 나타났다. 저농도인 25~100 µg/mL의 경우, 모든 처리구에서 105.63~87.37%의 세포생존율을 보여 유방암 및 위암세포주에 비해 성장억제효과가 크게 나타나지 않았지만, 400 µg/mL에서는 발아기간 및 처리압력이 증가함에 따라 유의적으로 세포생존율이 감소하는 경향을 나타내었다. 즉, 고압처리를 하지 않은 대조구는 발아전 91.69%였지만, 발아 4일차에는 53.34%로 유의적으로 감소하였으며, 4일차 발아콩을 150 MPa의 압력에서 처리하였을 때 39.79%로 감소하여 고농도에서는 발아와 고압처리에 의한 효과가 크게 나타났다. 이러한 결과는 발아콩으로부터 추출한 saponin 및 flavonol의 항산화 및

Table 3. Anti-proliferative effects of crude saponin extracts of black soybean treated by different high hydrostatic pressure treatments (0.1~150 MPa) and germination (0~4 days) in HCT-116 colon cancer cell

Pressure (MPa)	Germination periods (days)	Cell viability of HCT-116 colon cancer cell (%)				
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Con	0	100.35±1.58	99.66±1.37	98.37±2.37	90.37±1.45	80.37±3.65
	2	101.37±2.15	98.37±2.37	99.37±2.88	92.66±2.01	81.36±1.37
	4	99.37±1.66	98.37±2.37	100.37±5.37	88.37±2.37	75.37±2.37
0.1	0	101.55±1.25	98.37±1.25	97.37±1.59	87.37±2.37	78.37±2.37
	2	100.55±1.43	100.57±1.25	97.37±1.86	92.37±2.49	79.66±1.99
	4	99.37±2.37	98.37±2.37	99.37±2.35	87.37±2.13	76.37±1.89
50	0	105.37±3.35	102.37±1.78	99.66±4.37	92.37±1.78	82.37±3.65
	2	104.37±4.37	101.37±2.37	101.37±5.37	87.37±1.37	76.37±2.37
	4	101.37±3.13	100.66±2.37	98.37±4.37	85.37±3.67	74.37±2.37
100	0	100.54±5.36	102.37±3.37	97.37±1.37	90.37±4.37	75.37±4.67
	2	102.37±1.37	103.37±4.37	99.37±2.37	80.37±5.12	70.37±5.37
	4	100.66±2.44	100.37±2.37	97.37±3.37	82.37±2.37	69.37±4.37
150	0	99.88±1.37	101.37±1.56	95.37±2.37	85.37±7.45	74.37±2.37
	2	101.37±2.44	102.69±3.37	94.37±1.37	79.37±2.37	68.37±2.16
	4	100.34±2.76	100.37±5.37	95.37±2.12	75.37±3.45	57.37±4.36

Table 4. Anti-proliferative effects of crude saponin extracts of black soybean treated by different high hydrostatic pressure treatments (0.1~150 MPa) and germination (0~4 days) in PC-3 prostate cancer cell

Pressure (MPa)	Germination periods (days)	Cell viability of PC-3 prostate cancer cell (%)				
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Con	0	105.63±2.12	105.63±3.32	101.37±3.47	95.33±1.16	91.70±1.50
	2	104.62±1.12	100.15±1.79	96.69±2.44	83.91±0.90	77.78±4.87
	4	104.65±2.04	100.36±1.21	98.37±1.10	88.23±1.52	53.34±9.19
0.1	0	107.37±1.42	105.65±2.02	94.09±1.87	93.73±1.10	90.63±0.15
	2	103.65±1.55	98.02±2.44	90.37±1.43	80.34±0.68	75.55±4.02
	4	89.05±1.06	80.66±0.21	78.18±2.50	77.65±2.15	57.67±2.85
50	0	96.49±1.86	99.82±1.10	96.13±0.85	98.12±1.11	81.01±1.48
	2	100.02±1.10	100.37±2.96	99.37±3.46	80.28±2.50	80.28±2.14
	4	99.37±1.53	98.37±1.14	100.37±3.16	78.05±1.38	64.18±2.25
100	0	99.29±1.78	100.37±1.37	99.19±2.06	84.37±1.92	78.37±1.52
	2	98.37±1.50	98.06±1.08	97.37±5.07	78.37±1.98	71.37±1.93
	4	99.37±1.30	96.57±0.98	98.37±1.47	95.37±1.84	66.68±2.03
150	0	98.37±1.34	94.45±1.28	95.37±1.65	96.77±2.21	85.93±3.96
	2	100.79±1.98	93.37±1.98	90.37±1.00	78.81±1.88	65.37±2.39
	4	97.17±2.69	93.82±1.95	87.37±1.32	75.37±4.91	39.79±6.72

항암 활성에 대해 연구한 Guajardo-Flores 등(2013)의 연구에서 발아에 의해 Soyasaponin Bb, Bd, ag 및 βg의 함량이 증가함에 따라 전립선암세포주(PC-3)에 대한 세포생존율이 대조구에서는 77.7%이었지만, 5일간 발아하였을 때 41.2%로 감소하였다는 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

5. 위암세포(AGS) 성장억제효과

발아기간 및 처리압력에 따른 검정콩 조사포닌 추출물이 인체유래 위암세포주(AGS) 성장 억제에 미치는 영향을 측정 한 결과는 Table 5와 같다. 400 µg/mL 농도에서 암세포 성장 억제 효과를 살펴보면 고압처리를 하지 않은 대조구는 발아 전 67.02%였지만, 발아 2일 및 4일차에는 각각 63.26 및 45.23%의 세포생존율을 보여 발아기간이 증가함에 따라 위암 세포주(AGS)에 대한 증식억제효과가 증가하였다. 또한, 4일차 발아콩을 고압처리 하였을 때 처리 압력이 증가함에 따라 세포 생존율은 45.23~23.94%의 범위로 150 MPa까지 지속적으로 감소하여 150 MPa 처리구의 고압처리 발아콩은 유의적으로 높은 항암 활성을 나타내었다. 또한, 위암세포(AGS)의 경우, 다른 세포주에 비해 100 µg/mL의 저농도에서도 세포증식억제효과를 보여 150 MPa의 압력에서 고압처리 시 50 µg/mL의 농도에서 79.86~73.54% 범위의 세포생존율을 나타내었다. 된장추출물의 AGS 위암세포주에 대한 항암 및 Apoptosis 유도에 대한 Hwang 등(2005)의 연구에 따르면 대두 및 된장에 함유되어 있는 genistein, linoleic acid, β-sitosterol

및 Soyasaponin 등의 phytochemical은 위암세포주의 Apoptosis를 유도함에 따라 세포증식이 억제된다고 하였으며, 발아기간에 따른 콩나물의 사포닌 함량 변화에 대한 연구(Guajardo-Flores 등 2013)에서는 발아 일수가 증가함에 따라 조사포닌, B group의 Soyasaponin 및 Sosasapogenol의 함량이 증가한다고 하였다. 따라서 본 연구에서 위암세포(AGS)에 대한 항암 활성이 증가한 것은 다른 세포주와 마찬가지로 발아 및 고압 처리에 의해 항암 활성을 나타내는 Soyasaponin 함량이 증가함에 따른 것으로 판단되며, 향후 이러한 항암성분들에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 발아와 고압처리에 따른 검정콩 조사포닌 추출물의 *in-vitro* 항암 활성을 확인하기 위하여 검정콩을 발아시킨 후 고압처리하고, 조사포닌 추출물을 제조한 후 인체유래 유방암(MCF-7), 대장암(HCT-116), 전립선암(PC-3) 및 위암(AGS) 세포주에 대한 증식억제효과를 검토하였다. 대조구의 조사포닌 추출물은 400 µg/mL 농도에서 4종의 암세포주에 대하여 67.02~91.70% 범위의 생존율을 보여 항암 효과가 낮았지만, 발아 4일차 콩을 150 MPa의 압력에서 고압처리 한 검정콩의 조사포닌 추출물은 23.94~57.37% 범위의 생존율을 보여 발아와 고압처리에 의해 암세포 성장억제효과가 증가하였다. 특히, 위암세포(AGS)의 경우 다른 세포주에 비해

Table 5. Anti-proliferative effects of crude saponin extracts of black soybean treated by different high hydrostatic pressure treatments (0.1~150 MPa) and germination (0~4 days) in AGS gastric cancer cell

Pressure (MPa)	Germination periods (days)	Cell viability of AGS gastric cancer cell (%)				
		25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Con	0	110.15±1.17	92.16±2.34	90.76±2.28	79.56±6.10	67.02±3.76
	2	112.74±6.93	100.64±1.89	96.00±1.65	80.66±1.24	63.26±1.77
	4	102.71±1.37	102.93±1.94	96.96±3.15	72.55±2.30	45.23±5.20
0.1	0	108.24±1.00	91.87±1.44	84.64±1.57	72.99±5.48	66.73±1.84
	2	111.04±1.97	101.9±1.68	85.90±2.99	75.50±3.44	61.27±4.41
	4	103.45±4.64	89.66±1.88	83.76±5.98	71.22±1.97	50.80±6.36
50	0	101.82±5.69	91.72±2.11	87.37±2.42	78.89±2.74	63.15±0.77
	2	93.71±1.98	85.75±1.67	87.37±1.90	78.38±1.19	42.91±3.54
	4	95.26±4.23	80.51±2.08	79.48±4.77	77.57±1.84	39.82±1.11
100	0	95.82±4.16	77.94±2.78	75.47±4.86	70.54±3.36	35.50±4.97
	2	84.18±2.86	78.71±1.65	77.47±4.81	69.77±3.37	35.15±2.78
	4	81.87±2.21	80.64±1.01	72.70±1.62	61.90±3.11	32.84±3.93
150	0	81.02±2.21	79.86±3.05	87.65±5.44	54.19±5.52	42.21±0.81
	2	82.41±4.97	78.25±1.64	79.40±2.97	64.68±7.19	31.11±2.66
	4	78.17±2.44	73.54±3.11	72.62±1.27	53.27±3.31	23.94±3.58

저농도에서도 세포증식효과를 보여 가장 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 항암 활성을 나타내는 Soyasaponin, B group의 soyasaponin 및 soyasapogenol의 함량은 발아와 고압처리에 의해 증가하였고, 고압처리 발아공으로부터 항암 활성을 나타내는 사포닌 추출물의 개발이 가능할 것으로 생각된다. 또한, 추후 항암 활성 물질의 분리동정과 메커니즘 규명에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 316052-03)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Astadi IR, Astuti M, Santoso U, Nugraheni PS. 2009. *In vitro* antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem* 112:659-663
- Berhow MA, Cantrell CL, Duval SM, Dobbins TA, Maynes J, Vaughn SF. 2002. Analysis and quantitative determination of group B saponins in processed soybean products. *Phytochem Anal* 13:343-348
- Chung DS, Kim HK. 1998. Changes of protein and lipid composition during germination of *Perilla frutescens* seeds. *Korean J Life Sci* 8:318-325
- Ellington AA, Berhow M, Singletary KW. 2005. Induction of macroautophagy in human colon cancer cells by soybean B-group triterpenoid saponins. *Carcinog* 26:159-167
- Guajardo-Flores D, Serna-Saldivar SO, Gutierrez-Urbe JA. 2013. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 141:1497-1503
- Hwang KM, Lee JM, Park KY. 2005. Doenjang extract has anticancer activity and induces apoptosis in AGS human gastric adenocarcinoma. *Prev Nutr Food Sci* 10:167-171
- Ireland PA, Dziedzic SZ, Kearsley MW. 1986. Saponin content of soya and some commercial soya products by means of high performance liquid chromatography of the sapogenins. *J Sci Food Agric* 37:694-698
- Ishii Y, Tanizawa H. 2006. Effects of soyasaponins on lipid peroxidation through the secretion of thyroid hormones. *Biol Pharm Bull* 29:1759-1763
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in*

- in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520
- Kerwin SM. 2004. Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. *Curr Med Chem Anticancer Agent* 4:263-272
- Kim CT. 2009. High pressure technology for food-application and prospect as green technology. *Bull Food Technol* 22: 321-330
- Kim JS, Kim JG, Kim WJ. 2004. Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean J Food Sci Technol* 36:294-298
- Kim YH, Do SG, Kim DS, Woo SS, Kim OJ, Lee HJ. 2008. Evaluation of toxicity of anthocyanin from black soybean by feeding test in mice. *Korean J Food Nutr* 21:397-402
- Kinjo J, Hirakawa T, Tsuchihashi R, Nagao T, Okawa M, Nohara T, Okabe H. 2003. Effects of soyasapogenol B, sophoradiol, and their glucuronides on the cytotoxicity of tert-butyl hydroperoxide to HepG2 cells. *Biol Pharm Bull* 26:1357-1360
- Ko JY, Song SB, Lee JS, Kang JR, Seo MC, Oh BG, Kwak DY, Nam MH, Jeong HS, Woo KS. 2011. Changes in chemical components of foxtail millet, proso millet, and sorghum with germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:1128-1135
- Lee EH, Kim CJ. 2008. Nutritional changes of buckwheat during germination. *Korean J Food Cult* 23:121-129
- Lee IA, Park YJ, Yeo HK, Han MJ, Kim DH. 2010. Soyasaponin I attenuates TNBS-induced colitis in mice by inhibiting NF- κ B pathway. *J Agric Food Chem* 58:10929-10934
- Lee SO, Simons AL, Murphy PA, Hendrich S. 2005. Soyasaponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Exp Biol Med* 230:472-478
- Lee YR, Kim Y, Woo KS, Hwang IG, Kim KH, Kim KJ, Kim JH, Jeong HS. 2007. Changes in the chemical and functional components of Korean rough rice before and after germination. *Food Sci Biotechnol* 16:1006-1010
- Liu C, Li S, Tsao R, Li S, Zhang Y. 2017. Extraction and isolation of potential anti-stroke compounds from black soybean (*Glycine max* L. Merrill) guided by *in vitro* PC12 cell model. *J Funct Foods* 31:295-303
- Lopez A, El-Naggar T, Duenas M, Ortega T, Estrella I, Hernandez T, Gomez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. 2013. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 138:547-555
- Northrop DB. 2002. Effects of high pressure on enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta* 1595:71-79
- Oh BY, Park BH, Ham KS. 2003. Changes of saponin during the cultivation of soybean sprout. *Korean J Food Sci Tech* 35:1039-1044
- Park KU, Wee JJ, Kim JY, Jeong CH, Kang KS, Choi YS, Seo KI. 2005. Anticancer and immuno-activities of edible crude saponin from soybean cake. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34:1509-1513
- Ryoo SH, Kim SR, Kim KT, Kim SS. 2004. Isoflavone, phytic acid and oligosaccharide contents of domestic and imported soybean cultivars in Korea. *Korean J Food Nutr* 17:229-235
- San Martin MF, Barbosa-canovas GV, Swanson BG. 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:627-645
- Shimoyamada M, Okubo K. 1991. Variation in saponin contents in germinating soybean seeds and effect of light irradiation. *Agric Biol Chem* 55:577-579
- Shiraiwa M, Harada K, Okubo K. 1991. Composition and structure of "group B saponin" in soybean seed. *Agric Biol Chem* 55:911-917
- Xiao JX, Huang GQ, Zhang SH. 2007. Soyasaponins inhibit the proliferation of Hela cells by inducing apoptosis. *Exp Toxicol Pathol* 59:35-42

Received 11 October, 2018
 Revised 26 November, 2018
 Accepted 30 November, 2018