

대두 및 대두발효식품의 항돌연변이성

윤기도* · 권동진 · 홍석산 · 김수일¹ · 정건섭²

한국식품개발연구원 생물공학연구부, ¹서울대학교 농화학과, ²연세대학교 생물자원공학과

Inhibitory Effect of Soybean and Fermented Soybean Products on the Chemically Induced Mutagenesis. Ki-Do Yoon*, Dong-Jin Kwon, Seok-San Hong, Su-Il Kim¹ and Kun-Sub Chung². *Food Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-Dong, Bundang-Gu, Songnam, Kyunggi-Do 463-420, Korea.* ¹Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea. ²Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Maeji, Heungup, Wonju, Kangwon-Do 222-710, Korea - To investigate the inhibitory effect of soybean and Korean traditional fermented soybean products on the chemically induced mutagenesis, we extracted soybean, *Kanjang*, *Doenjang*, *Kochujang*, and *Chongkukjang* with water, methanol and hexane. Inhibitory effect of the extracts was assayed by the SOS chromotest using *Escherichia coli* PQ37 as a test strain. 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), and aflatoxin B₁(AFB₁) were used as mutagens. Methanol extracts showed relatively higher inhibitory effect than water and hexane extracts. Methanol extracts of soybean, *Doenjang*, *Kochujang*, and *Chongkukjang* showed inhibitory effect of 68.4, 96.3, 17.5, and 100.9%, against MNNG, and 28.6, 109.1, 41.3, and 101.8% against AFB₁, respectively. *Doenjang* methanol extract showed inhibitory effect of 51.0, 96.3, and 109.1% against 4NQO, MNNG, and AFB₁, respectively. Methanol extract of *Doenjang* showed dose-dependent inhibitory effect against 4NQO, MNNG, and AFB₁. Inhibitory effect of heat-treated *Doenjang* and *Chongkukjang* methanol extracts on the mutagenicity of MNNG and AFB₁ was remained over 95% of the inhibitory effect of heat-untreated extracts, demonstrating the heat stability of the potent antimutagenic activity.

오늘날 암으로 인한 사망자수는 전체 사망자수의 큰 부분을 차지하고 있으며, 건강한 삶을 위하여 암을 예방하거나 치료하기 위한 연구가 매우 활발히 진행되어져 왔다(1). 우리가 일상적으로 섭취하는 식품은 암을 유발하는 원인이 되기도 하지만 반대로 암을 억제하는 기능을 보이기도 한다(2-4). 식품 중의 항암성분들은 유전자의 손상을 방지하여 암의 initiation 단계를 차단하는 성분(conjugated linoleic acid, flavones, phenols 등)과 promotion 및 progression 단계를 억제하는 성분(protease inhibitors, inositol hexaphosphate 등)으로 크게 구분된다(2). 식품의 항돌연변이성에 대한 연구는 이러한 암 예방의 차원에서 야채류(5), 녹차, 죽순, 참깨 등(6) 다양한 종류에 대해서 진행되어져 왔다. 국내에서도 쌀(7, 8), 김치(9), 장류(10), 마늘(11), 썬바귀(12), 녹황색 채소류(13), 산채류(14) 등의 항돌연변이성에 대한 연구결과가 발표되어 있다. 박 등(10)은 재래식 된장에 aflatoxin B₁(AFB₁)에 의해 유도되는 돌연변이성을 억제하는 효과가 있음을 보고하였는데, 된장의 methanol 추출물이 AFB₁에 대한 강력한 항돌연변이성을 나타내었으며, 된장 추출물 50% 농도에서 AFB₁에 의한 돌연변이성은 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100으로 Ames test한 결과 완전히 저해된다고 밝

혔다. 또한, 재래식 된장이 일본된장보다 항돌연변이성이 더 뛰어난 것으로 보고하였다. 홍과 권(15)은 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 항돌연변이성을 Ames test로 조사하였는데, 돌연변이원으로는 *Salmonella typhimurium* TA 98의 diagnostic mutagen인 2-aminofluorene (2-AF), 식품이 곰팡이에 오염될 때 생성될 수 있는 mycotoxin으로 발암성을 지니는 aflatoxin B₁(AFB₁), 식품의 요리과정에서 생성되는 aminopyridine이나 amino-N-methyl imidazole 같은 아미노산 열분해물이 함유되어 있는 태운 삼치의 methanol 추출물을 사용하였다. 그 결과 된장은 세가지 돌연변이원에 대하여 각각 79, 65, 68%의 항돌연변이성을 보여 돌연변이 억제효과가 가장 컸으며, 고추장, 간장 순으로 돌연변이 억제효과가 있는 것으로 보고하였다. 그러나, Ames test를 이용한 항돌연변이성 측정에서는 장류시료에 함유된 histidine이 항돌연변이성 측정에 영향을 미칠 수 있기 때문에 histidine의 영향을 받지 않는 SOS chromotest를 실시하여 장류의 항돌연변이성을 확인할 필요가 대두되었다.

따라서 본 논문에서는 SOS chromotest를 이용하여 대두 및 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 대두발효식품의 항돌연변이성을 조사하여 확인하였고 이를 보고한다.

*Corresponding author.

Key words: Fermented soybean products, antimutagenic effect, SOS chromotest

시료의 제조 및 열처리

시료의 추출은 물, 메탄올, 헥산 등을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 시료에 추출용매를 10배(v/w) 첨가하여 믹서기로 잘 마쇄하고 7시간씩 3번 추출하였다. 이 추출액을 감압농축한 후 물 또는 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹이고 제균여과시켜 실험에 사용하였다. 시료의 열처리는 상기와 같이 제조된 시료를 Eppendorf tube에 넣고 100°C에서 0~60분간 실시한 후 실험에 사용하였다.

SOS chromotest

Pasteur Institute(France)의 M. Hofnung 박사로부터 분양받은 *E. coli* PQ37 균주를 이용한 SOS chromotest는 Quillardet과 Hofnung(16)의 방법을 일부 변경하여 다음과 같이 실시하였다. 돌연변이원을 실험목적에 따라 적절한 농도로 제조한 후 96 well plate에 well당 3 μ l 씩 주입하였다. *E. coli* PQ37 하룻밤 배양액 100 μ l를 La 배지(Bactotryptone 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10 g, Ampicillin 20 mg/l distilled water) 5 ml에 넣고 2시간 활성화 시키고, 이 균액 1 ml를 다시 취하여 9 ml L 배지(Bactotryptone 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10 g/l distilled water)(간접 변이원의 경우 S9 mixture)에 희석 시켜서 96 well plate에 well당 97 μ l 씩 주입하여 시료와 혼합하였다. 이 혼합액을 37°C에서 2시간 동안 120 rpm에서 진탕배양하여 SOS 반응을 유도하였다. 발색시약으로는 β -galactosidase의 경우 *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG, 4 mg/ml B buffer)를, alkaline phosphatase의 경우 PNPP (4 mg/ml P buffer)를 well당 100 μ l 씩 주입하여 37°C에서 10~90분간 반응시켰다. 효소반응을 중지시키기 위하여 β -galactosidase의 경우 1M Na₂CO₃ 용액을 well당 100 μ l 씩 주입하였고, alkaline phosphatase의 경우 1.5N NaOH 용액을 well당 100 μ l 씩 주입하였다. ELISA reader(Molecular Device Co.)로 420 nm에서 흡광도를 측정하고, 효소단위(1,000×A₄₂₀)/t, t는 효소 반응시간, R값(β -galactosidase 효소단위/alkaline phosphatase 효소단위) 및 Induction Factor(IF=R(c)/R(0), R(c): 시료농도(c)에서의 R 값, R(0): 시료농도가 0일 때의 R 값)를 구하였다. Blank는 균만 첨가하지 않은 것으로 하였으며, 음성 대조구는 물 또는 DMSO를 사용한 것을, 그리고 양성 대조구는 돌연변이원을 사용한 것으로 하였다.

항돌연변이성 측정

항돌연변이성을 측정하기 위하여 돌연변이원의 IF가 높고 균의 생장을 억제하지 않는 농도를 구하였고, 2배씩 연속 희석시킨 시료용액과 돌연변이원을 혼합한 것을 각 well에 3 μ l 씩 주입하였다. 이후 실험방법은 상기의 돌연변이원성 실험방법과 동일하게 실시하여, 효소단위, R 값, IF를 구하였고, 항돌연변이성(Inhibition

rate(%)=[(IFpc-IFs)/(IFpc-1)]×100, IFpc: 돌연변이원만 있을 때의 IF 값, IFs: 돌연변이원과 시료를 동시에 첨가하였을 때의 IF 값)을 구하였다.

장류추출물의 항돌연변이성

대두 및 대두 발효식품인 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 용매 추출물의 직접변이원 4NQO와 MNNG 및 간접변이원 AFB₁에 대한 항돌연변이성을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 돌연변이원 MNNG에 대해서 메탄올 추출물이 물 추출물이나 헥산 추출물보다 높은 항돌연변이성을 나타내었다. 메탄올 추출물의 농도를 100 μ g/assay로 하였을 경우 대두, 된장, 고추장, 청국장은 각각 68.4, 96.3, 17.5, 100.9%의 항돌연변이성을 나타내었다. 물 추출물은 비교적 양호한 항돌연변이성을 나타내었으며, 헥산 추출물은 간장시료를 제외하고는 5.6% 이하의 항돌연변이성을 나타내었다. 간접변이원인 AFB₁에 대해서 대두, 된장, 고추장, 청국장의 메탄올 추출물과 간장을 100 μ g/assay의 농도로 처리하였을 경우 각각 28.6, 109.1, 41.3, 101.8, 23.9%의 항돌연변이성을 나타내었다. 홍과 권(15)은 Ames test를 이용한 장류의 항돌연변이 측정 실험에서 된장, 고추장의 메탄올 추출물과 간장이 AFB₁에 대하여 각각 68, 47, 45%의 항돌연변이성을 나타낸다고 밝힌 바 있는데, SOS chromotest를 이용한 장류의 항돌연변이성 측정결과도 유사한 경향을 보여주고 있음을 확인하였다. Ames test에서는 장류시료에 함유된 histidine의 영향으로 20 μ 보다 많은 양의 시료를 첨가하는 실험이 불가능하였으나, SOS chromotest의 경우 histidine의 영향을 받지 않으므로 시료의 양을 높일 수 있었고, 결과적으로 된장 메탄올 추출물과 청국장 메탄올 추출물이 AFB₁의 돌연변이성을 완전히 억제함을 확인하였다.

항돌연변이성은 대두보다 대두발효식품인 된장, 청국장 등에서 더 높게 나타났는데 이는 박 등(10)이 대두와 된장의 추출물에 대해 Ames test한 결과 된장 추출물의 항돌연변이성이 더 높게 나타났다는 보고와 일치한다. 대두 발효과정에서 항돌연변이 활성을 가지는 물질이 생성되는 것으로 추측된다.

장류추출물은 돌연변이원의 종류에 따라 다른 항돌연변이성을 나타내었다. 된장 메탄올 추출물의 경우 MNNG, AFB₁에 대해서는 모두 95% 이상의 항돌연변이성을 나타내었지만, 4NQO에 대해서는 51%의 비교적 낮은 항돌연변이성을 나타내었다. 또한, 돌연변이원 4NQO에 대해서는 모든 시료가 60% 이하의 항돌연변이성을 보여주었다. 이는 돌연변이원의 종류에 따라 작용기작이 다르므로, 항돌연변이 활성도 돌연변이원에 따라 서로 다른 경향을 보이는 것으로 여겨진다.

된장 메탄올 추출물의 농도가 항돌연변이성에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 직접변이원 4NQO에 대해서 된장 메탄올 추출물의 농도가 높을수록 항돌연변이

Table 1. Comparison of inhibitory effect of various extracts* from fermented soybean products on the mutagenicity of 4NQO, MNNG, and AFB₁ in SOS chromotest.

	Extraction solvent	4NQO (5 ng/assay)		MNNG (500 ng/assay)		AFB ₁ (20 ng/assay)	
		IF	Inhibition rate (%)	IF	Inhibition rate (%)	IF	Inhibition rate (%)
Positive control**		3.121± 0.111		3.700± 0.129		3.796± 0.141	
Soybean	Water	2.102± 0.050	48.0	2.846± 0.195	31.6	2.983± 0.133	29.1
	Methanol	2.614± 0.105	23.8	1.854± 0.054	68.4	2.997± 0.009	28.6
	Hexane	2.598± 0.175	24.7	3.662± 0.021	1.4	3.525± 0.146	9.7
Kanjang	non	2.464± 0.107	31.0	2.211± 0.166	55.1	3.129± 0.062	23.9
	Hexane	2.616± 0.046	23.8	1.148± 0.041	94.5	3.472± 0.082	11.6
Doenjang	Water	2.168± 0.166	44.9	1.477± 0.059	82.3	2.994± 0.035	28.7
	Methanol	2.039± 0.075	51.0	1.100± 0.080	96.3	0.746± 0.078	109.1
	Hexane	2.196± 0.011	43.6	3.684± 0.005	0.6	1.423± 0.049	84.9
Kochujang	Water	2.477± 0.095	30.4	3.395± 0.171	11.3	3.632± 0.040	5.9
	Methanol	2.639± 0.154	22.7	3.227± 0.170	17.5	2.640± 0.085	41.3
	Hexane	2.407± 0.009	33.7	3.550± 0.100	5.6	1.330± 0.045	88.2
Chongkukjang	Water	1.888± 0.080	58.1	1.289± 0.146	89.3	3.381± 0.024	14.8
	Methanol	2.641± 0.013	22.6	0.975± 0.030	100.9	0.949± 0.079	101.8
	Hexane	2.266± 0.025	40.3	3.654± 0.025	1.7	1.019± 0.088	99.3

*The concentration of extracts was 100 µg/assay.

**Only mutagens were used for the induction of SOS response.

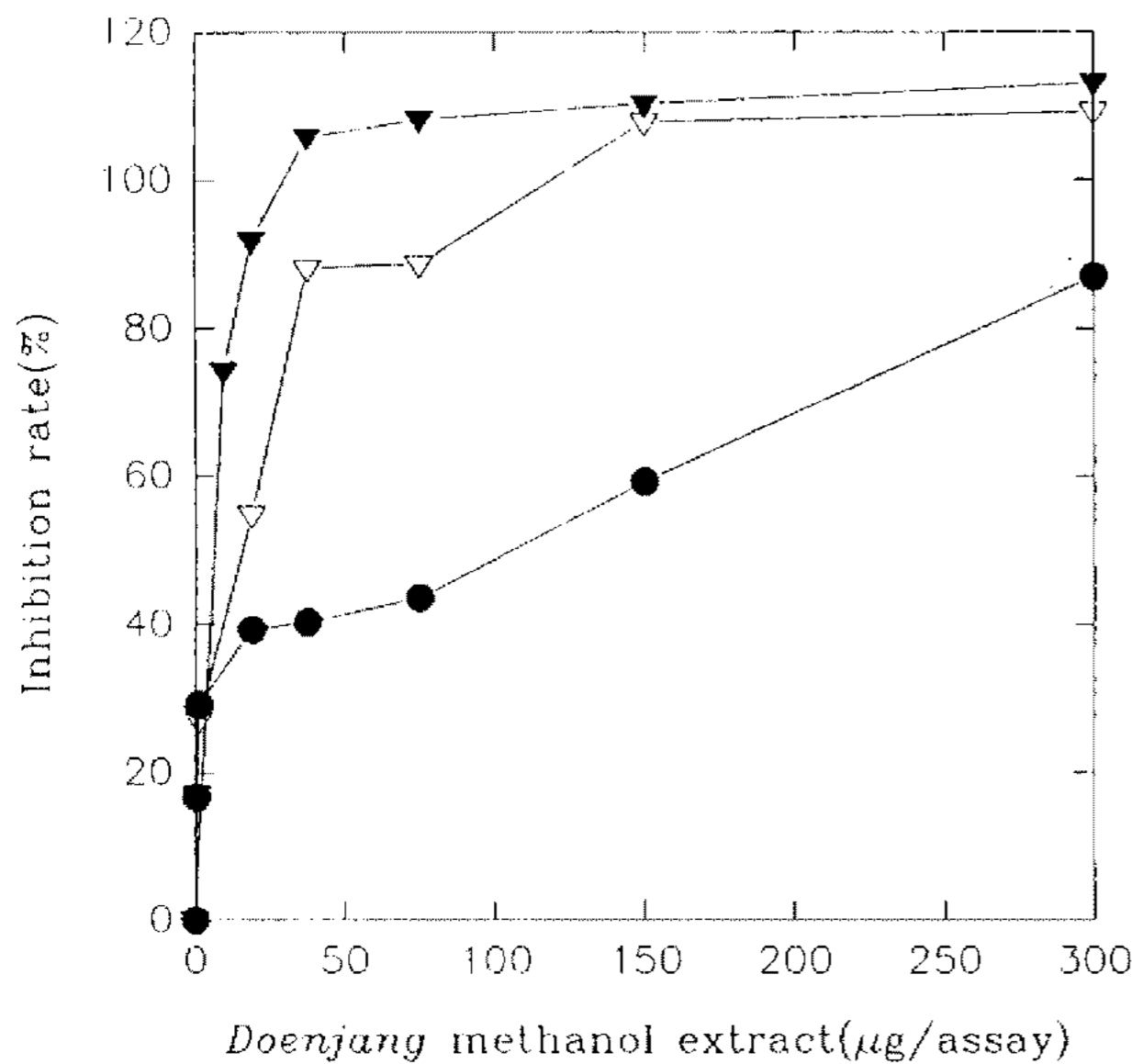


Fig. 1. Dose-dependent inhibitory effect of Doenjang methanol extract on the mutagenicity of 4NQO, MNNG, and AFB₁ in SOS chromotest.

●: 4NQO ▽: MNNG ▼: AFB₁

성이 증가하였으며, 시료농도 300 µg/assay에서 87%의 항돌연변이성을 보였다. MNNG에 대해서는 시료농도가 증가함에 따라 항돌연변이성이 점차 증가하다가 시료농도 150 µg/assay에서 107.8%의 항돌연변이성을 나타내었고, 이후에는 일정한 수준을 유지하였다. 간접변이원 AFB₁에 대해서도 시료농도가 증가함에 따라 항돌연변이성이 점차 증가하다가 시료농도 37.5 µg/assay에

Table 2. Effect of heat treatment on the inhibitory effect of Doenjang and Chongkukjang methanol extracts* on the mutagenicity of MNNG and AFB₁.

(Relative inhibition rate, %)

Heating time at 100°C (min)	Doenjang methanol extract		Chongkukjang methanol extract	
	MNNG	AFB ₁	MNNG	AFB ₁
0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	100.6± 0.8	98.4± 1.7	97.7± 1.4	101.3± 1.1
20	99.8± 0.3	98.7± 1.7	96.5± 1.3	103.5± 1.0
30	99.6± 1.0	98.0± 1.8	96.9± 1.4	103.5± 0.3
60	99.1± 0.4	95.1± 2.1	95.0± 0.8	102.9± 0.1

*The concentration of extracts was 100 µg/assay.

서 105.8%의 항돌연변이성을 나타내었고, 이후에는 일정한 수준을 유지하였다. 또한, 된장 메탄올 추출물은 18.8 µg/assay의 농도에서 4NQO, MNNG, AFB₁에 대하여 각각 39.3, 54.8, 91.9%의 항돌연변이성을 보여 AFB₁에 대한 항돌연변이 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

장류추출물의 열처리가 항돌연변이성에 미치는 영향

된장 메탄올 추출물과 청국장 메탄올 추출물의 열처리가 항돌연변이성에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. 두 시료 모두 100°C에서 60분간 열처리한 후에도 직접변이원 MNNG와 간접변이원 AFB₁에 대하여 열처리하지 않은 것의 95% 이상의 항돌연변이성을 보

였다. 이는 홍과 권(15)의 결과와 일치하며, 항돌연변이 활성 물질이 열처리 과정에서 실활되지 않고 열에 안정함을 보여준다.

참고문헌

1. Doll, R. and R. Peto. 1981. The cause of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**: 1191-1308.
2. Bailey, G.S. and D.E. Williams. 1993. Potential Mechanisms for Food-related carcinogens and anticarcinogens. *Food Technology* **47**(2): 105-118.
3. Starvic, B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Fd. Chem. Toxic.* **32**: 79-90.
4. Ames, B.N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* **221**: 1256-1264.
5. Lai, C.N., M.A. Butler, and T.S. Matney. 1980. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mut. Res.* **77**: 245-250.
6. Ruan, C.C., Y. Liang, J.L. Liu, W.S. Tu, and Z.H. Liu. 1992. Antimutagenic effect of eight natural foods on moldy foods in a high liver cancer incidence area. *Mut. Res.* **279**: 35-40.
7. 전향숙, 김인호, 김영진, 김길환. 1994. 쌀 추출물의 돌연변이 억제효과. *한국식품과학회지* **26**: 188-194.
8. 김인호, 전향숙, 문태화. 1995. 현미의 항돌연변이 활성 물질의 구성성분. *한국농화학회지* **38**: 478-483.
9. 박건영. 1995. 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. *한국영양식량학회지* **24**: 169-182.
10. 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식. 1990. 된장의 aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 효과. *한국영양식량학회지* **19**: 156-162.
11. 박건영, 김소희, 서명자, 정해영. 1991. 마늘의 돌연변이 유발 억제 및 HT-29 결장암세포의 성장 저해 효과. *한국식품과학회지* **23**: 370-374.
12. 김소희. 1995. 썬바귀 추출물들의 돌연변이 유발억제 및 MG-63 암세포 성장 저해 효과. *한국영양식량학회지* **24**: 305-312.
13. 박건영, 이경임, 이숙희. 1992. 녹황색 채소류의 돌연변이 유발 억제 및 AZ-521 위암세포의 성장저해효과. *한국영양식량학회지* **21**: 149-153.
14. 함승시. 1988. 산채류 가열증의 돌연변이 억제 작용에 관한 연구. *한국농화학회지* **31**: 38-45.
15. 홍석산, 권동진. 1994. 한국식품개발연구원 연구보고서(E 1286-0501).
16. Quillardet, P. and M. Hofnung. 1985. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mut. Res.* **147**: 65-78.

(Received 10 April 1996)