

장류 중의 돌연변이 억제물질 탐색

홍석산·권동진
생물공학연구부

1. 서 론

사람의 疫學자료에 의하면 일부 식품, 특히 과일과 녹황색 채소의 다량섭취가 일부 종양의 발생을 감소시켰다¹⁾. 여러 방법에 의한 동물실험에서도 식품에서 유래되었거나 합성된 물질로서 500여종 이상이 발암물질의 작용을 저해하였다²⁾.

이 물질들에는 vitamins, 미량 광물질, 식물체 유래의 화합물과 protease inhibitors, 식품의 첨가물과 가공산물, 의약품 그리고 심지어는 공업 오염물인 Aroclor 1254도 포함되어 있다. 사람의 암 예방에 있어서 이 물질들의 역할은 아직 밝혀지지 않고 있다. 천연항암물질들은 식사중 여러 성분들이 복합적으로 섭취되기 때문에 연구에 많은 어려움이 있다.

식품 속의 항암물질은 세 부류로 나눌 수 있는데, 그 하나는 precursors로부터 (pro)carcinogen의 형성을 막는 물질이고, 다른 하나는 발암물질로부터 DNA의 손상을 방지하는 물질이며 나머지 하나는 손상된 세포가 암세포로 변화하는 것을 막는 물질이다³⁾.

식품과 관련된 발암물질에는 여러 종류가 있지만 특히 mycotoxin과 amino산의 열분해물이 대표적인 것이다.

Mycotoxin은 주로 *Aspergillus*, *Penicillium* 및 *Fusarium* 속의 곰팡이가 생산한다⁴⁾. 여기에는

afatoxin B₁, 및 M₁, ochratoxin A, zearalenone, fusariums, T-2 toxin, sterigmatocystin, luteoskyrin 등이 포함되는데, 이들은 독성과 발암성이 매우 강하다고 알려져 있다⁵⁾.

Aflatoxin은 주로 땅콩, 목화씨, 옥수수 등에 재배기간이나 수확후 저장시에 *Aspergillus flavus*와 *A. parasiticus*에 의하여 만들어지는데⁶⁾, 동물실험을 통하여 사람에게 간암을 일으킬 수 있음이 입증되었다⁷⁾.

Polycyclic aromatic hydrocarbon과 같은 amino산의 열분해물은 요리과정에서 불완전 연소나 열분해에 의해 형성되는 돌연변이원이다. 그들은 돼지고기, 소고기, 닭고기, 양고기 그리고 생선의 근육 속에 있는 creatinine, amino산, 당들이 반응하여 생성된다. 최소한 20여종의 구조가 밝혀졌는데 주로 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b]-indole(Trp-P-1)과 같은 aminopyridine과 2-amino-3-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)과 같은 amino-N-methylimidazole이다.

Amino산 열분해물의 생성량은 주로 고기의 조성, 특히 creatine과 당함량, 그리고 요리시간과 방법에 따라 달라진다⁸⁾. 근육의 creatine 함량이 돌연변이원의 생성량과 비례함이 밝혀졌다. 조리방법에 따라서는 pan frying과 broiling이 돌연변이원을 많은 양 생성시키고 deep frying과 stewing이 덜 생성시킨다. 요리온도가 중요해서 최종 온도가

가 150이하이면 더 높은 온도에 비해 훨씬 적은 양의 amino산 열분해물을 생성시킨다.

한편 외국의 연구동향을 살펴보면, 1977년 Sugimura가 이 식품 돌연변이원을 발견한 이래 Ames assay와 같은 test system에서 이 물질들의 강한 돌연변이 작용 때문에 많은 연구가 이루어졌으며, 이 화합물들은 그들의 돌연변이력보다는 훨씬 낮은 정도지만 원숭이를 포함한 동물실험에서 모두 암을 발생시키는 것으로 보고하였다⁹⁾.

일본의 대두발효식품인 miso의 섭취빈도와 위암에 의한 사망율에 대한 연구가 일본에서 실시된 바 있으며¹⁰⁾, 또한 miso는 방사선에 의하여 유발되는 위암과 간암의 발생을 억제하였다고 보고한 바가 있고¹¹⁾, 일본식 간장인 shoyu를 생쥐에게 급여하였을 때 benzo[a]pyrene에 의하여 유발되는 前胃의 종양발생을 억제하였다고 보고하였다¹²⁾.

이상의 연구 결과들은 우리의 전통발효식품인 된장과 간장에도 유사한 항암효과가 있을 가능성을 강하게 시사하고 있다.

지금까지 알려진 발암물질의 약 85%가 돌연변이를 일으키며 10% 이하의 비발암물질이 돌연변이를 일으킨다¹⁴⁾. 이것은 두 가지 특성 사이에 높은 상관관계가 있음을 나타내며 암의 상당부분이 체세포의 돌연변이에 의해 유발된다는 사실을 의미한다. 따라서 항돌연변이 효과는 체세포의 돌연변이에 의한 암발생을 효과적으로 예방하는 요인이 될 수 있다.

Miso에서 분리된 미생물들이 mutagenic pyrolyzates를 cell wall에 결합시켜 돌연변이 활성을 억제한다고 보고되었다¹⁵⁾.

간장의 갈색화 반응물질인 melanoidins가 aflatoxin B₁에 의한 돌연변이를 유의적으로 감소시켰는데, 이는 갈색물질의 항산화성과 aflatoxin B₁에 대한 비돌연변이성 물질로의 전환작용 때문이라고 생각되고 있다¹⁶⁾.

따라서, 본 연구는 장류의 항암효과를 밝히기 위한 기초실험으로 장류의 항돌연변이원성을 조사하고자 수행하고 있으며 이중 현재까지수행된 결과를 소개하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 시약

가정에서 제조된 된장, 간장, 고추장 및 청국장 은 경기도 김포군, 충북 중원군, 전북 순창군 및 경남 울산시에서 채취한 것으로 된장, 간장 및 고추장의 경우 제조된 지 6~8개월 지난 것이었다. 시판 된장, 양조간장, 혼합간장 및 고추장은 시장 점유율이 큰 4개 회사의 제품을 사용하였다.

2-aminofluorene, aflatoxin B₁ 및 Ames test에 쓰이는 시약은 Sigma 사(St.Louis, MO USA)의 제품을 사용하였다. Rat liver S₉은 Organon Teknika사(Durham, N. C. USA)의 제품을 사용하였다. 장류 시료의 추출에 필요한 methanol 및 hexane과 butanol은 Merck사 (Darmstadt, F.R. Germany)의 제품을 사용하였다.

2.2 실험방법

(1) 시료의 추출 및 분획

된장, 고추장 및 청국장 시료를 mortar에서 잘 마쇄하여 methanol을 10배(v/w) 첨가하여 흔들면서 7시간씩 3번 추출하였다. 이 추출액을 멸균여과시키고 감압농축한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, 분광계용급)를 넣어서 추출전 시료의 무게와 같게 하여 실험에 사용하였다. 간장은 멸균여과시켜서 그대로 실험에 사용하였다.

시료를 분획하기 위하여 된장, 고추장 및 청국장의 감압농축된 methanol추출물과 간장을 멸균여과시켜 hexane, butanol순으로 분획하고 용매를 제거하여 hexane, butanol 및 수용성 분획을 얻었다. Hexane 및 butanol분획은 감압농축시켜 용매를 제거하고 수용성 분획은 동결건조시킨 뒤 DMSO를 첨가하여 추출전 시료의 무게(g)와 같게 한 후 실험에 사용하였다.

(2) 시료의 열처리

열처리된 장류 시료의 항돌연변이원성을 조사하기 위하여 장류 시료 10g에 증류수 30ml을 넣고 15분간 100℃로 가열하여 앞에서 적은 방법대로

추출 및 분획하였다.

(3) 항돌연변이 실험

돌연변이물질로는 2-aminofluorene 및 aflatoxin B₁은 DMSO에 녹여서 실험에 사용하였는데 그 농도는 각각 1mg/ml 및 40µg/ml이었다. 태운 삼치의 methanol 추출물(methanol extract of charred saury pike : MECS)를 만들기 위하여 소금에 절인 삼치를 석쇠 위에서 직화로 구운 다음 탄 부분을 긁어모아 methanol 500ml에 1일간 추출하여 여과하고 감압농축한 뒤 DMSO로 2배 희석하여 사용하였다.

실험방법은 Preincubation mutagenicity test법을 이용하였다¹⁷⁾.

Salmonella typhimurium TA98을 사용하였으며, S₉은 plate당 30µl를 넣었다.

얼음 속의 13×100mm capped culture tube에 S₉mix 0.5ml, bacterial culture 0.1ml, 장류시료 20µl, mutagen 용액 50µl를 적혀진 순서대로 넣고 37°C에서 20분간 흔들면서 반응시켰다. 대조실험으로 장류 시료나 mutagen 용액을 넣지 않을 때는 같은 양의 DMSO를 넣었다.

Antimutagenicity는 $[(a-b)/(a-c)] \times 100(\%)$ 로 나타냈는데, 여기서 a는 돌연변이원만 존재할 경우의 복귀돌연변이 균수, b는 돌연변이원과 장류시료를 넣었을 때의 복귀돌연변이 균수, c는 돌연변이원과 장류시료가 없는 경우의 자연복귀돌연변이 균수이다.

Data는 Duncan's Multiple Range Test와 T Test(LSD)로 분석하였다¹⁸⁾.

3. 결과 및 고찰

장류의 돌연변이 억제효과를 조사하기 위하여 먼저 돌연변이원을 선발하여야 한다. 본 연구에서는 2-aminofluorene(2-AF), 태운 삼치의 methanol 추출물(methanol extract of charred saury pike : MECS) 및 aflatoxin B₁(AFB₁)을 돌연변이원으로 사용하였다. 이들을 돌연변이원으로 선정하는 이유는 2-AF가 *Salmonella typhimurium* TA98의 diagnostic mutagen이고¹⁷⁾, AFB₁이 식품이 곰팡

이에 오염될 때 생성될 수 있는 mycotoxin으로 발암성을 지니며⁴⁾, 또한 태운 삼치에는 식품의 요리 과정에서 생성되는 aminopyridine이나 amino-N-methylimidazole 같은 amino산의 열분해물이 함유되어 있는데 이들은 모두 강한 돌연변이 작용 및 발암력을 지니고 있으므로⁴⁾ 식품 속에 존재할 수 있는 대표적인 돌연변이원으로 고려되었기 때문이다.

3.1 돌연변이원 농도가 돌연변이에 미치는 영향

돌연변이원의 첨가량 결정을 위한 실험 결과, 2-AF의 경우 첨가량이 50µg이하일 때는 2-AF의 첨가량에 비례하여 revertant의 수가 급격하게 증가하였으나, 50µg보다 클 때는 revertant의 수가 별로 증가하지 않았으므로 2-AF의 첨가량을 plate당 50µg으로 결정하였다. MECS은 첨가량이 25µl이하일 때는 MECS의 첨가량에 비례하여 revertant의 수가 증가하였으나, 25µl보다 클 때는 오히려 revertant의 수가 감소하였으므로 MECS 첨가량을 plate당 25µl로 결정하였다.

AFB₁은 첨가량이 1.0µg이하일 때는 AFB₁의 첨가량에 비례하여 revertant의 수가 서서히 증가하였으나, 1.0µg보다 클 때 revertant의 수가 빠르게 증가하였으므로 AFB₁의 첨가량을 plate당 2.0µg으로 결정하였다.

3.2 S₉ 농도가 돌연변이에 미치는 영향

발암물질은 작용기작에 따라 genotoxic compound와 non-genotoxic compound로 나누어진다⁴⁾. Genotoxic compound는 염색체를 파손시키거나 유전자에 돌연변이를 일으켜서 유전자의 구조나 기능을 파괴한다. Mycotoxin, polyaromatic hydrocarbon, N-nitrosamine 그리고 polycyclic amine과 같은 식품에 관련된 유전자 독소는 그 자체로는 발암력이 없고 세포의 효소에 의하여 highly electrophilic metabolite로 전환되어 target organ의 DNA와 공유결합을 하여 돌연변이 및 암

을 일으킨다.

따라서 plate당 첨가하는 S₉의 적정량을 조사하였다. 실험에 사용된 3종류의 mutagen은 모두 S₉을 첨가하지 않을 때 돌연변이를 일으키지 않는 activation-dependent mutagen이었으며, 2-AF는 10μl의 S₉을 첨가할 때 revertant가 가장 많이 생겼고, MECS와 AFB₁은 각각 50μl와 30μl의 S₉을 첨가할 때 가장 많은 수의 revertant가 나타났다. 그러나 실험과정을 단순화시키기 위하여 3종류의 돌연변이원에 대해 동일하게 plate당 30μl의 S₉을 첨가하기로 결정하였다.

3.3 장류의 항돌연변이원성

장류의 抗突然變異原性 측정실험에서 methanol

로 추출하여 농축한 장류시료들을 20μl 첨가하였는데, 이 보다 더 많은 양을 첨가할 경우에는 시료 중의 histidine으로 인한 loan현상이 나타나 돌연변이원성 抑制能 측정이 불가능하였다.

표 1은 장류 시료의 돌연변이원성 억제능 측정 결과를 나타낸 것이다. 3가지 mutagen에 대한 돌연변이 억제효과는 가정에서 제조된 된장이 가장 컸고 다음이 가정제조 고추장, 시판 된장, 시판 고추장, 가정제조 간장 및 시판 양조간장, 시판 혼합간장 순으로 작아졌다. 이는 가정에서 제조된 장류가 시판 장류보다 돌연변이 억제효과가 우수하다는 것을 나타내며, 또한 산분해 간장보다는 양조간장의 돌연변이 억제효과가 큼을 의미한다. AFB₁에 대한 간장의 돌연변이 억제효과는 매우 작았다.

Table 1. Antimutagenicity^z of Doenjang, Kanjang, and Kochujang

Mutagens	Antimutagenicity (%)						
	Doenjang		Kanjang		Kochujang		
	Homemade	Commercial	Homemade	Commercial		Homemade	Commercial
				Fermented	Chemically hydrolyzed		
2-AF	79 ^a	75 ^{ab}	38 ^c	39 ^c	32 ^d	76 ^{ab}	74 ^b
MECS	68 ^a	48 ^b	45 ^b	45 ^b	30 ^d	47 ^b	35 ^c
AFB ₁	65 ^a	43 ^c	8 ^d	8 ^d	2 ^e	49 ^b	44 ^c

^zMeans in the same row followed by the same letter are not significantly (P ≤ 0.05) different.

Table 2. Autimutagenicity of raw (R) and heat-treated (H) Doenjang, Kanjang, and Kochujang

Mutagens	Antimutagenicity (%)													
	Doenjang				Kanjang				Kochujang					
	Homemade		Commercial		Homemade		Commercial		Homemade		Commercial			
	R	H	R	H	R	H	Fermented		Chemically hydrolyzed		R	H	R	H
							R	H	R	H				
2-AF	79	51*	75	48*	38	40	39	38	32	30	76	79	74	76
MECS	68	58*	48	39*	45	41	45	42	30	24*	47	44	35	30*
AFB ₁	65	65	43	43	8	10	8	8	2	3	49	53*	44	50*

*Significant difference in means between raw and heat-treated samples at P < 0.05.

표 2는 100℃에서 15분의 열처리가 장류의 돌연변이 억제효과에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 된장의 경우 열처리가 2-AF와 MECS에 대한 돌연변이 억제효과를 조금 감소시켰으나 AFB₁에 대한 돌연변이 억제효과에는 영향을 주지 못하였다. 또한 열처리가 산분해 간장과 시판 고추장의 MECS에 대한 돌연변이 억제효과를 감소시킨 반면, 고추장의 AFB₁에 대한 돌연변이 억제효과는 오히려 촉진시켰다. 그러나 그 밖의 다른 경우에는 열처리가 mutagen에 대한 돌연변이 억제효과에 영향을 미치지 못하였다. 이상의 결과는 장류의 돌연변이 억제효과가 열처리에 의하여 소실되지 않음을 의미하여 또한 장류에 존재하는 항돌연변이원성 물질이 열에 안정하다는 사실을 나타낸다.

표 3은 열처리된 장류의 돌연변이원성 억제능 측정 결과를 나타낸 것이다. 2-AF에 대한 돌연변이 억제효과는 고추장이 가장 컸고 된장, 간장 및 청국장 순이었다. MECS에 대한 돌연변이 억제효과는 된장이 가장 컸고 산분해 간장이 가장 작았다. AFB₁에 대한 돌연변이 억제효과는 청국장이 가장 컸고 된장 및 고추장, 간장 순이었다. 열처리를 하진 않았을 경우(표 1)와 같이 가정에서 제조된 장류가 시판 제품보다 돌연변이 억제효과가 컸으며, 산분해 간장보다는 양조 간장의 돌연변이 억

제효과가 컸다.

이상의 연구결과는 식품속에 함유될 가능성이 있는 여러 발암물질이 장류와 함께 조리되거나 섭취될 경우 발암물질의 돌연변이력이 저하되어 체세포의 돌연변이 작용에 의한 암발생을 예방할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다.

앞으로 장류의 돌연변이 억제작용이 mutagen에 대한 영향의 결과인지 아니면 mutagen을 활성화시키는 S₀에 함유된 효소의 작용을 억제한 결과인지를 밝히는 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 Ames test를 변형한 돌연변이 억제효과 측정에서는 장류 시료에 함유된 histidine때문에 20μl보다 많은 양의 시료를 첨가하는 실험이 불가능하므로 시료에 함유된 histidine에 의해 영향을 받지 않는 SOS·chromotest에 의한 보완실험이 필요하다고 생각된다.

앞으로 장류의 돌연변이 억제활성을 나타내는 성분이 어느 원료에서 유래되었으며 발효과정을 통하여 돌연변이 억제활성이 어떻게 변화하는지를 규명하고, 동물실험을 통하여 이의 항암효과를 입증하면 기능성이 강화된 우수한 품질의 장류를 산업적으로 생산하는데 필요한 기초자료를 얻을 수 있을 것이다.

Table 3. Antimutagenicity^z of geat-treated Doenjang, Kanjang, Kochujang, and Chongkukjang

Mutagens	Antimutagenicity (%)							
	Doenjang		Kanjang		Kochujang		Chongkukjang	
	Homemade	Commercial	Homemade	Commercial	Homemade	Commercial		
			Fermented		Chemically hydrolyzed			
2-AF	51 ^c	48 ^{cd}	40 ^{de}	38 ^{de}	30 ^e	79 ^a	68 ^b	39 ^{de}
MECS	58 ^a	39 ^b	41 ^b	42 ^b	24 ^d	44 ^b	30 ^c	29 ^c
AFB ₁	65 ^b	43 ^e	10 ^f	8 ^f	3 ^g	53 ^c	50 ^d	68 ^a

^zMeans in the same row followed by the same letter are not significantly (P≤0.05) different.

4. 참고문헌

1. Hartman, P. E. and D. M. Shankel. 1990. *Environ. Molec. Carcin.* 15:145-182.
2. Wattenberg, L. W. 1990. *Proc. Am. Assn. Cancer Res.* 32:461-463.
3. Wattenberg, L. W. 1985. *Cancer Res.* 45:1-8.
4. Baily, G. S. and D. E. Williams. 1993. *Food Technol.* Feb:105-118.
5. Hsieh, D. P. H. 1989. In "Food Toxicology, A Perspective on the Relative Risks", ed. S. L. Taylor and R. A. Scanlan, pp.57-100. Marcel Dekker, Inc., New York.
6. Pohland, A. E. and G. E. Wood. 1991. In "Mycotoxins, Cancer, and Health", Pennington Center Nutritional Series, Vol. 1., ed. G. A. Bray and D. H. Ryan, pp.32-52. Louisiana State Univ. Press, Baton Rouge.
7. Yeh, F-S., M. C. Yu, C-C. Mo, S. Luo, M. J. Tong, and B. E. Henderson. 1989. *Cancer Res.* 49:2506-2509.
8. Hotchkiss, J. H. 1989. In "Food Toxicology, A Perspective on the Relative Risks", ed. S. L. Taylor and R. A. Scanlan, pp.57-100. Marcel Dekker, Inc., New York.
9. Hecht, S. S. and D. Hoffman. 1988. *Carcinogenesis* 9:875-884.
10. 平山雄. 1984. "豫防ガン學" 中外製藥株式會社.
11. Watanabe, H., T. Takahashi, T. Ishimoto, and A. Ito. 1991. *Science and Technology of Miso* 39:29-32.
12. Benjamin, H., J. Storkson, A. Nagahara, and M. W. Pariza. 1991. *Cancer Res.* 51:2940-2942.
13. Nagahara, A., H. Benjamin, J. Sorkson, J. Krewson, K. Sheng, and W. Liw. 1992. *Cancer Res.* 52:1754-1756.
14. Carlton, B. C. and B. J. Brown. 1981. In "Manual of Methods for General Bacteriology", ed-in-chief P. Gerhardt, pp. 222-242. Amer. Soc.for Microbiol., Washington, D. C.
15. Asahara, N., X. B. Zhang, and Y. Ohta. 1992. *J. Sci. Food Agric.* 58:395-401.
16. 박 건영, 이 은숙, 문 숙희, 최 홍식. 1989. 한국식품과학회지 21:419-424.
17. Maron, D. M. and B. N. Ames. 1983. *Mutation Res.* 113:173-215.
18. SAS Institute, Inc. 1985. *SAS User's Guide : Statistics*, 5th ed. SAS Institute Inc., Cray, NC.