

## 멸치젓갈추출물이 돌연변이 유발에 미치는 영향

정근옥 · 강갑석\* · 박진영

부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, \*부산정보대학 레저산업과

### Effect of Fermented Anchovy Extracts on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-Induced Mutagenicities

Keun-Ok Jung, Kap-Suk Kang\* and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, Pusan National University,

\*Department of Leisure Industry, Pusan College of Information Technology

#### Abstract

The effects of raw anchovy, salted raw anchovy (20% salt+anchovy), 6- and 12-month fermented anchovy (20% salt added) on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced mutagenicities were evaluated using *Salmonella* assay and the SOS chromotest. The methanol extracts from raw, salted and the fermented anchovy (FA) sample increased the revertants of *Salmonella typhimurium* TA100 at the level of 0.125~5 mg/plate in Ames test. The salted raw anchovy extract induced the largest number of the revertants. All the FA extracts had comutagenic effect on the MNNG. Twelve-month FA juice exerted the lowest comutagenic activity among the FA samples. The comutagenicity of 12-month FA was due to the synergistic effect of salt and histidine which teem in FA. Thus the Ames test using histidine requiring mutant, *S. typhimurium*, is not appropriate to determine the mutagenicity of FA which is rich in histidine. In SOS chromotest using *E. coli*, raw, salted and fermented anchovy extracts did not show any mutagenicity in the absence of MNNG. The raw and fermented anchovy samples blocked the SOS response of *E. coli* PQ37 induced by MNNG, while raw salted anchovy increased the SOS induction factor. Twelve-month FA juice showed higher antimutagenic effects than 6-month FA samples (both solid and liquid). The ripened (12-month) FA along with raw anchovy in the SOS chromotest exhibited antimutagenic activity.

Key words : Mutagenicity, MNNG, Ames test, SOS chromotest, Fermented anchovy

#### 서 론

쌀을 주식으로 하는 동남아 각 국에서는 예부터 기호식품으로서 젓갈류가 애용되어 왔다<sup>(1)</sup>. 젓갈은 식염만을 침장원으로 사용하여 생선에서 흘러나온 액체 속에 어체가 완전히 잠긴 상태에서, 육질 부위의 효소적 가수분해가 부분적으로 일어난 발효수산물의 명칭으로 육질 부위의 효소적 가수분해산물인 유리아미노산, 그 외의 비단백성질소화합물과 혼산 관련 물질들이 조화되어 고유의 독특한 맛을 생성한다. 또한 유리아미노산의 현저한 증가가 수반되므로 소화, 흡수가 용이한 고단백식품으로 취급될 수 있다.

Corresponding author : Kun-Young Park, Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National Univ., 30 Jang Jun-dong, Keum Jung-Ku, Pusan 609-735, Korea  
Tel : 82-51-510-2839  
Fax : 82-51-514-3138  
E-mail : kunpark@hyowon.pusan.ac.kr

우리나라에서의 젓갈에 관한 최초의 문헌 기록은 삼국사기에 신라 신문왕이 왕비를 맞는 폐백 품목에 쌀, 술, 간장, 된장, 육포 등과 함께 젓갈이 나오며, 중국 송나라 사람이 고려를 보고 쓴 고려도경에 “세민(細民)이 바다에서 나는 식품을 많이 먹는다. 그 맛이 짜고 비린내가 나지만 오랫동안 먹으면 먹을 만하다.”는 기록으로 보아, 젓갈이 주요 식품으로 고려시대에 귀천없이 먹던 일상 반찬이었음을 알 수 있다<sup>(2)</sup>.

젓갈은 과거에는 일반가정에서 소규모로 제조되어 있으나, 현재는 공장생산 판매량이 늘어나고 있다. 최근 멸치젓갈은 멸치에 소금을 첨가(20~25%)하여 12~18개월간 실온에서 발효시킨 다음, 고형물을 여과하여 제거한 멸치액젓의 형태로 시중에 널리 유통되고 있는데 이는 김치양념, 간장대용, 무침이나 절임 등의 다양한 용도로 이용되고 있다<sup>(3)</sup>. 특히 김치제조에서 멸치젓갈은 맛과 염도를 맞추어 주는 매우 중요한 김치의 부재료로 사용된다.

그러나 멸치젓은 많은 양의 소금과 아민류를 함유하고 있고<sup>(4,5)</sup>, 김치 숙성 중 채소류에서 유래한 아질산염과 아민이 반응하여 니트로소아민(NA)이 생성될 수 있어 그 안전성에 대한 문제가 제기되어 왔다.<sup>(6,7)</sup>. 김 등<sup>(7)</sup>은 젓갈을 사용하거나 사용하지 않고 만든 모든 김치에서 nitrosodimethylamine(NDMA)은 흔적량 (0.05~2 µg/kg)이 검출되었고, nitrosodiethylamine(NDEA)과 nitrosopyrrolidine(NPYR)은 전혀 검출되지 않았다고 하였다. 최<sup>(8)</sup>의 결과에서도 NDMA는 5°C에서 발효 3주까지 생성되지 않았으며, 6주 발효의 젓갈김치에서 최고량인 0.044 ppb가 검출되었을 정도로 그 생성량은 미량이었다. 또한 젓갈이 첨가된 김치는 비타민C 등의 니트로소아민 생성 저해작용으로 돌연변이 유발효과가 없었고<sup>(8,9)</sup>, 오히려 비타민 C, β-carotene, 섬유소, 후라보노이드류, 클로로필 등의 생체조절영양소에 의한 항암효과가 있음이 입증되었으나<sup>(10,11)</sup>, 젓갈 자체에 대한 안전성 검토가 이루어지지 않고 있다. 따라서 전통식 품으로서 젓갈산업이 지속되기 위해서는 젓갈의 안전성 및 기능성에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 멸치, 소금에 절인 멸치 및 발효된 멸치젓의 돌연변이 및 보돌연변이 유도 여부를 검토하기 위하여 생멸치, 생멸치에 소금(천일염)을 첨가한 것, 6개월간 발효된 멸치젓 건더기 및 액, 12개월간 발효된 멸치액젓을 경남, 기장(대변)에서 구입하여 사용하였다. 생멸치는 크기가 12~15 cm로 1998년 2월에 기장에서 잡은 것을 사용하였고, 6개월간 발효시킨 멸치젓같은 1997년 9월에 잡은 멸치에 20% 소금을 첨가하여 1998년 2월까지 실온에서 발효시킨 것으로 어체와 액을 분리하여 각각 시료로 이용하였으며, 12개월간 발효시킨 멸치액젓은 1997년 3월에 잡은 멸치에 20%소금을 첨가한 후 1998년 2월까지 실온에서 발효한 다음 3번 여과하여 제품화 된 것을 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 멸치젓 시료

멸치젓 원료 및 발효된 멸치젓의 돌연변이 유도 여부를 관찰하기 위하여 생멸치, 생멸치에 소금(천일염)을 첨가한 것, 6개월간 발효된 멸치젓 건더기 및 액 그리고 12개월간 발효된 멸치액젓을 경남, 기장(대변)에서 구입하여 사용하였다. 생멸치는 크기가 12~15 cm로 1998년 2월에 기장에서 잡은 것을 사용하였고, 6개월간 발효시킨 멸치젓같은 1997년 9월에 잡은 멸치에 20% 소금을 첨가하여 1998년 2월까지 실온에서 발효시킨 것으로 어체와 액을 분리하여 각각 시료로 이용하였으며, 12개월간 발효시킨 멸치액젓은 1997년 3월에 잡은 멸치에 20%소금을 첨가한 후 1998년 2월까지 실온에서 발효한 다음 3번 여과하여 제품화 된 것을 사용하였다.

### 추출물 조제

동결건조시킨 각각의 시료를 마쇄하여 분말을 조제

하고 분말시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복하여 여과한 후 회전식 진공 농축기로 농축하여 메탄올 추출물(methanol extract)을 얻었다. 메탄올추출물은 hexane : methanol(1 : 1, v/v)으로 3회 추출하여 hexane fraction과, methanol soluble fraction으로 분획하였으며, 이들 추출물들은 멸균증류수에 회석하여 실험에 사용하였다.

### Ames 돌연변이 유발 실험

*Salmonella typhimurium* TA100은 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 요구성 균주로서 미국 California대학의 B. N. Ames박사로부터 제공받아 정기적으로 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하면서 실험에 사용하였다. 돌연변이 유발물질인 N-methyl-N-nitrosoguanidine(MNNG)은 Aldrich Chemical Co.(USA)에서 구입하여 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

균주에 대한 시료의 독성유무를 살펴보기 위해서 실험에 사용하기 전에 독성실험을 행하여 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 시료의 농도를 결정하였다. 먼저 멸균된 cap test tube에 top agar 2 mL를 분주한 후, 균주 100 µL( $1\sim2\times10^9$  cells/mL)와 시료를 첨가하고 가볍게 교반한 후 nutrient agar plate에 분주, 고화시켜서 37°C에서 24시간 배양시킨 다음, 그 독성유무를 판정하였다.

미리 전열 멸균시킨 cap test tube에 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 mL, 하룻밤 배양된 균주 0.1 mL( $1\sim2\times10^9$  cells/mL)와 돌연변이 유발물질(50 µL) 및 회석된 멸치젓갈 시료(50 µL)를 가하여 37°C에서 20분간 예비 배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C) 2 mL씩을 가하고 3초간 교반하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다<sup>(12,13)</sup>.

돌연변이 억제효과의 정도(inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate}(\%) = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀돌연변이의 수이다.

### SOS chromotest

Quillardet의 방법을 변형시킨 백과 함<sup>(14)</sup>의 방법을 사

용하였다. 냉동 보관된 *E. coli* PQ37균주 50 μL를 5 mL의 L 배지에 접종하고 37°C에서 흡광도가 0.3~0.4에 이를 때까지 2시간 동안 진탕 배양시킨 후, 여기서 얻은 균주를 L 배지에 1/10로 회석하였다. 각 농도별로 준비된 시료와 돌연변이 유발물질의 혼합액 20 μL를 미리 분주해 둔 96 well plate의 각 well에 위의 회석된 균주 100 μL씩 분주하고 90분간 37°C에서 진탕 후, SOS 반응을 유도하였다. 그 다음 β-galactosidase의 활성 측정을 위해 ONPG(o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) 100 μL, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase의 활성 측정을 위해 PNPP(p-nitrophenyl phosphate disodium) 100 μL를 첨가하였다. 발색시간은 10분으로 하였으며, β-galactosidase는 1.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100 μL, alkaline phosphatase는 1 M HCl 50 μL로 효소에 의한 발색반응을 정지시키고 5분 후 alkaline phosphatase쪽에 50 μL의 2 M Tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 OD<sub>420</sub>값은 Miller<sup>(15)</sup>의 공식에 의해 enzyme unit(Eu)값을 구하였다.

$$Eu = \frac{(1000 \times A_{420})}{t \text{ (min)}}$$

#### 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Ames test에서 돌연변이 유발에 미치는 영향

Ames 실험체에서 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 생멸치 및 멸치젓갈 메탄올추출물의 돌연변이 유

발성을 농도별로 검토한 결과는 Table 1과 같다. 시료 0.125~0.5 mg/plate 첨가농도에서는 모든 시료가 돌연변이 유발성을 보이지 않았다. 자연복귀돌연변이수 126 ± 12개에 비해 생멸치 메탄올추출물은 1.25 mg/plate 첨가농도부터 돌연변이성이 높아지기 시작하여 5 mg/plate 첨가농도에서는 311 ± 13개의 복귀돌연변이 수를 나타내었다. 생멸치에 20%의 소금을 첨가한 시료의 경우는 2.5 mg/plate와 5 mg/plate 첨가농도에서 각각 생멸치 메탄올추출물보다 2배 이상 많은 556 ± 21, 665 ± 29개의 복귀돌연변이 수를 나타내어 생멸치에 소금이 첨가되면 유의적으로 돌연변이가 더 많이 유발됨을 관찰할 수 있었다( $p<0.05$ ). 5 mg/plate 첨가농도에서 소금에 절인 멸치는 665 ± 29, 6개월간 발효된 멸치젓의 건더기는 458 ± 20, 액은 271 ± 13, 12개월 발효된 액젓은 321 ± 33개의 복귀돌연변이수를 나타내어 발효되면서 돌연변이 유발성이 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다( $p<0.05$ ).

멸치 및 멸치젓 메탄올추출물을 0.625~2.5 mg/plate로 처리하여 Ames test에서 MNG에 대한 보돌연변이 유발실험을 한 결과는 Table 2와 같다. 생멸치 메탄올추출물은 0.625 mg/plate와 1.25 mg/plate 첨가농도에서 각각 427 ± 23, 484 ± 20개의 복귀돌연변이 수를 나타내어 항돌연변이 효과를 나타내었다. 생멸치 메탄올추출물은 2.5 mg/plate를 첨가했을 때 대조군보다 유의적으로 많은 804 ± 16개의 복귀돌연변이수를 나타내었다( $p<0.05$ ). 소금에 절인 멸치 메탄올추출물은 0.625 mg/plate 첨가농도에서는 512 ± 18개의 복귀돌연변이 수를 나타내어 보돌연변이성을 나타내지 않았으나, 2.5 mg/plate 첨가농도에서는 981 ± 44개의 많은 복귀돌연변이 수를 나타내어 생멸치에 소금을 첨가했을 때 유의적으로 보돌연변이 유발이 촉진됨을 관찰할 수 있었다( $p<0.05$ ). 모든 첨가농도에서 발효된 멸치젓이 생멸치

Table 1. Effect of methanol extracts from anchovy and fermented anchovy on the mutagenicity in the *Salmonella typhimurium* TA100

Sample(mg/plate)	Revertants/plate					
	0.125	0.25	0.5	1.25	2.5	5
Spontaneous	126 ± 12 <sup>bc</sup>	126 ± 12 <sup>c</sup>	126 ± 12 <sup>c</sup>	126 ± 12 <sup>d</sup>	126 ± 12 <sup>c</sup>	126 ± 12 <sup>c</sup>
Raw anchovy	160 ± 15 <sup>a</sup>	171 ± 8 <sup>a</sup>	191 ± 18 <sup>a</sup>	231 ± 19 <sup>b</sup>	259 ± 21 <sup>cd</sup>	311 ± 13 <sup>c</sup>
Raw anchovy + salt <sup>1)</sup>	125 ± 3 <sup>bcd</sup>	130 ± 4 <sup>c</sup>	154 ± 13 <sup>b</sup>	278 ± 6 <sup>a</sup>	556 ± 21 <sup>a</sup>	665 ± 29 <sup>a</sup>
6 months FAS <sup>2)</sup>	115 ± 6 <sup>cd</sup>	115 ± 8 <sup>c</sup>	129 ± 2 <sup>c</sup>	235 ± 20 <sup>b</sup>	356 ± 30 <sup>b</sup>	458 ± 20 <sup>b</sup>
6 months FAL <sup>3)</sup>	133 ± 6 <sup>b</sup>	153 ± 4 <sup>b</sup>	156 ± 10 <sup>b</sup>	180 ± 6 <sup>c</sup>	224 ± 29 <sup>d</sup>	271 ± 13 <sup>a</sup>
12 months FAJ <sup>4)</sup>	108 ± 9 <sup>d</sup>	124 ± 8 <sup>c</sup>	135 ± 8 <sup>bc</sup>	171 ± 10 <sup>c</sup>	270 ± 16 <sup>c</sup>	321 ± 33 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Raw anchovy : salt = 80 : 20

<sup>2)</sup>Fermented anchovy solid

<sup>3)</sup>Fermented anchovy liquid

<sup>4)</sup>Fermented anchovy juice

<sup>a-d</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

**Table 2. Comutagenic effect of methanol extracts from anchovy and fermented anchovy on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.2 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100**

Sample	Revertants/plate		
	0.625 mg/plate	1.25 mg/plate	2.5 mg/plate
Spontaneous	90±11	90±11	90±11
Control	606±28 <sup>c</sup>	606±28 <sup>c</sup>	606±28 <sup>f</sup>
Raw anchovy	427±23 <sup>c</sup>	484±20 <sup>f</sup>	804±16 <sup>e</sup>
Raw anchovy+salt <sup>1)</sup>	512±18 <sup>d</sup>	660±30 <sup>d</sup>	981±44 <sup>d</sup>
6 months FAS <sup>2)</sup>	975±47 <sup>b</sup>	1184±21 <sup>b</sup>	1327±20 <sup>b</sup>
6 months FAL <sup>3)</sup>	1136±22 <sup>a</sup>	1260±32 <sup>a</sup>	1490±18 <sup>a</sup>
12 months FAJ <sup>4)</sup>	957±31 <sup>b</sup>	1051±40 <sup>c</sup>	1187±26 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Raw anchovy : salt = 80 : 20<sup>2)</sup>Fermented anchovy solid<sup>3)</sup>Fermented anchovy liquid<sup>4)</sup>Fermented anchovy juice<sup>a-f</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.**Table 3. Effect of methanol extracts from fermented anchovy and histidine on the mutagenicity without or with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG; 0.2 µg/plate) in the *Salmonella typhimurium* TA100**

Sample	Concentration(µg/plate)	Revertants/plate	
		MNNG -	MNNG +
Spontaneous		108±10 <sup>d</sup>	108±10
Control(MNNG)			621±34 <sup>e</sup>
12 months FAJ <sup>1)</sup>	2500	308±18 <sup>c</sup>	1103±34 <sup>a</sup>
Histidine	4	126±12 <sup>d</sup>	681±29 <sup>d</sup>
	8 <sup>2)</sup>	134±20 <sup>d</sup>	752±34 <sup>c</sup>
	16	153±12 <sup>c</sup>	798±37 <sup>b,c</sup>
	32	189±9 <sup>b</sup>	832±19 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Fermented anchovy juice<sup>2)</sup>2500 µg of methanol extract from fermented anchovy juice contains 8 µg of histidine<sup>a-f</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

나 소금에 절인 멸치보다 높은 보돌연변이 유발성을 보였으나, 12개월간 발효시킨 멸치젓갈이 6개월간 발효시킨 멸치젓갈보다 유의적으로 낮은 보돌연변이성을 나타내었다( $p<0.05$ ).

Ames test에서 histidine첨가량을 높이면 돌연변이 유발이 증진되는데 멸치젓갈은 histidine함량이 높으므로 histidine이 복귀돌연변이수를 증가시켰을 가능성이 있다. 따라서 12개월간 발효시킨 멸치젓갈의 histidine함량을 측정한 결과 12개월간 발효시킨 멸치젓갈 메탄올추출물 5000 µg에는 16 µg의 histidine이 함유되어 있었다. Ames test에서 histidine이 돌연변이유발에 미치는 영향을 살펴본 결과(Table 3), histidine 자체로도 농도 의존적으로 돌연변이를 증가시켜 32 µg/plate 농도에서는 자연복귀돌연변이수의 2배정도의 복귀돌연변이수를 나타내었다. 또한 histidine을 MNNG와 함께 처리하였을 때 12개월간 발효시킨 멸치젓갈보다는 낮으나 유의적으로 보돌연변이 유발성이 있었다( $p<0.05$ ). 12개월 된 멸치젓 시료는 멸치액젓을 동결건조하여 메탄올추

출물을 제조하였으므로 많은 양의 소금을 함유하고 있다. MNNG에 의한 돌연변이 실험에서 소금과 histidine을 함께 첨가해 본 결과(Table 4), 12개월간 발효시킨 멸치액젓 2.5 mg에 함유된 천일염 1.4 mg과 histidine 8 µg은 2310±17개의 복귀돌연변이수를 나타내어 12개월간 발효시킨 멸치액젓(1140±29개)보다 2배 이상 높은 보돌연변이성을 보였다. 따라서 histidine의 함량이 높은 멸치젓갈의 안전성을 Ames test로만 판정하는 것은 바람직하지 못한 것으로 생각된다.

SOS Chromotest에서 돌연변이 유발에 미치는 영향 시료에 함유된 histidine에 의해 영향을 받지 않는 SOS chromotest에서의 보돌연변이 효과를 살펴보기 위해 *E. coli*의 변이주인 PQ37을 이용하여 MNNG에 대한 보돌연변이 실험을 하였다. 먼저 멸치 및 멸치젓 메탄올추출물 자체의 돌연변이 유발성을 검토한 결과는 Table 5와 같다. Ames test에서와는 달리 모든 시료가 돌연변이 유발성을 나타내지 않았다. 이<sup>(16)</sup>의 연

**Table 4. Comutagenic effect of methanol extracts from fermented anchovy, salt, histidine and histidine+salt on mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG; 0.2 µg/plate) in *Salmonella typhimurium TA100***

Sample	Revertants/plate
Spontaneous	127 ± 9
Control	793 ± 33 <sup>e</sup>
12 months FAJ <sup>1)</sup> 2.5 mg	1140 ± 29 <sup>c</sup>
Chunil salt 0.7 mg	937 ± 32 <sup>f</sup>
1.4 mg	1617 ± 54 <sup>d</sup>
Chunil salt 1.4 mg + histidine 4 µg	2239 ± 16 <sup>c</sup>
8 µg <sup>j</sup>	2310 ± 17 <sup>b</sup>
16 µg	2369 ± 20 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Fermented anchovy juice

<sup>2)</sup>2.5 mg of methanol extract from fermented anchovy juice contains chunil salt 1.4 mg and 8 µg of histidine

<sup>a-f</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

구 결과에서도 *in vivo Drosophila* 돌연변이 검출계에서 발생 단계상의 독성효과가 없는 범위에서 각 시료들을 단독 처리했을 때 모든 시료가 자연발생 빈도와 유사하게 나타나 그 자체로는 돌연변이 유발성이 없었다.

MNNG와 함께 멸치 및 멸치젓의 메탄올추출물을 각 well 당 25~100 µg을 처리한 결과(Table 6), 25, 100 µg 처리시 생멸치 메탄올추출물은 각각 13, 35%의 돌연변이 유발 저해효과를 보였다. 그러나 소금을 첨가한 생멸치 메탄올추출물은 25 µg의 낮은 농도에서도 대조군(MNNG 처리군)과 같은 2.97의 SOS induction

factor를 나타냈고 100 µg 첨가농도에서는 3.67의 높은 SOS induction factor를 나타내어 소금의 첨가로 보돌연변이성이 높아짐을 확인할 수 있었다. 발효된 멸치젓 메탄올추출물은 25 µg 첨가시 13-18%의 항돌연변이 효과를 보였으나 첨가농도가 100 µg으로 높아지면서 5-15%로 오히려 돌연변이 억제효과가 감소되었고, 또한 생멸치(35%)보다 낮은 돌연변이 유발 억제효과를 보였다. 따라서 첨가되는 소금 농도가 높아지면  $\beta$ -galactosidase의 활성이 높아져 보돌연변이를 유발한 것으로 보인다.

이<sup>(16)</sup>는 *in vivo Drosophila* 돌연변이 검출계에서 MNNG의 체세포 돌연변이 유발에 미치는 영향을 살펴본 결과, 소금에 절인 멸치는 small *mwh* spots와 large *mwh* spots의 출현빈도에 대해 모두 보돌연변이 효과를 보였다. 한편 12개월간 발효한 멸치액젓이 6개월간 발효한 멸치액젓 보다 높은 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 충분히 발효되지 않은 멸치젓갈의 경우 소금에 의한 보돌연변이가 유발될 수 있다고 하였다.

멸치젓갈에서 돌연변이 유발물질 및 활성물질을 찾기 위해서 멸치젓갈의 메탄올추출물을 hexane추출물과 methanol soluble fraction(MSF)으로 나누어 SOS chromotest를 하였다(Table 7). 이 경우 젓갈에 사용되는 주요 침장원인 소금은 수용성물질로 MSF에 존재하며 hexane 추출물에는 지방산을 포함한 지용성 물질들이 남게된다. 50 µg/well과 100 µg/well 첨가농도에서 모두 소금에 절인 멸치의 MSF는 메탄올추출물보다 보돌연변이성이 높았다. 12개월간 발효시킨 멸치젓갈 역

**Table 5. SOS response of methanol extract from anchovy and fermented anchovy in *E. coli* PQ37**

Sample	$\beta$ -Galactosidase( $\beta$ )		Alkaline phosphatase(p)		$(\beta)/(p)$	SOS induction factor
	OD <sub>420</sub>	Unit	OD <sub>420</sub>	Unit		
Spontaneous	0.523 ± 0.01	17.4	0.424 ± 0.02	14.1	1.23	1.00
	25 µg/plate					
Raw anchovy	0.537 ± 0.02	17.9	0.447 ± 0.01	14.9	1.20	0.98
Raw anchovy+salt <sup>1)</sup>	0.512 ± 0.03	17.1	0.453 ± 0.01	15.1	1.13	0.91
6 months FAS <sup>2)</sup>	0.534 ± 0.02	17.8	0.436 ± 0.02	14.5	1.23	1.00
6 months FAL <sup>3)</sup>	0.519 ± 0.01	17.3	0.448 ± 0.03	14.9	1.16	0.91
12 months FAJ <sup>4)</sup>	0.510 ± 0.01	17.0	0.465 ± 0.01	15.5	1.10	0.89
	100 µg/plate					
Raw anchovy	0.526 ± 0.01	17.5	0.441 ± 0.02	14.7	1.19	0.97
Raw anchovy+salt <sup>1)</sup>	0.543 ± 0.01	18.1	0.425 ± 0.01	14.2	1.27	1.03
6 months FAS <sup>2)</sup>	0.524 ± 0.05	17.5	0.431 ± 0.01	14.4	1.22	0.99
6 months FAL <sup>3)</sup>	0.538 ± 0.07	17.9	0.435 ± 0.01	14.5	1.17	0.95
12 months FAJ <sup>4)</sup>	0.533 ± 0.01	17.8	0.426 ± 0.01	14.2	1.25	1.06

<sup>1)</sup>Raw anchovy : salt = 80 : 20

<sup>2)</sup>Fermented anchovy solid

<sup>3)</sup>Fermented anchovy liquid

<sup>4)</sup>Fermented anchovy juice.

**Table 6. SOS response of methanol extract from anchovy and fermented anchovy against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37**

Sample	β-Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		(β)/(ρ)	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
	OD <sub>420</sub>	Unit	OD <sub>420</sub>	Unit			
Spontaneous Control	0.490±0.01 1.498±0.04	16.3 49.9	0.424±0.02 0.436±0.01	14.1 14.5	1.16 3.44	1 2.97	
25/plate							
Raw anchovy	1.500±0.02	50	0.471±0.01	15.7	3.15	2.71	13
Raw anchovy+salt <sup>1)</sup>	1.641±0.03	54.7	0.475±0.01	15.7	3.45	2.97	-
6 months FAS <sup>2)</sup>	1.439±0.02	48.0	0.455±0.02	15.2	3.16	2.72	13
6 months FAL <sup>3)</sup>	1.437±0.01	47.9	0.466±0.03	15.5	3.08	2.65	16
12 months FAJ <sup>4)</sup>	1.411±0.01	47.0	0.465±0.01	15.5	3.03	2.61	18
100/plate							
Raw anchovy	1.173±0.01	39.1	0.441±0.02	14.7	2.66	2.29	35
Raw anchovy+salt <sup>1)</sup>	1.736±0.1	57.9	0.408±0.01	13.6	4.26	3.67	-
6 months FAS <sup>2)</sup>	1.271±0.05	42.4	0.381±0.01	12.7	3.34	2.88	5
6 months FAL <sup>3)</sup>	1.282±0.07	42.7	0.394±0.01	13.1	3.25	2.80	9
12 months FAJ <sup>4)</sup>	1.284±0.01	42.8	0.413±0.01	13.8	3.11	2.68	15

<sup>1)</sup>Raw anchovy : salt = 80 : 20<sup>2)</sup>Fermented anchovy solid<sup>3)</sup>Fermented anchovy liquid<sup>4)</sup>Fermented anchovy juice.**Table 7. SOS response of methanol extract from anchovy and fermented anchovy against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, 40ng/assay) in *E. coli* PQ37**

Conc. (μg/well)	Sample	β-Glactosidase(β)		Alkaline phosphatase(ρ)		(β)/(ρ)	SOS induction factor	Inhibition rate(%)
		OD <sub>420</sub>	Unit	OD <sub>420</sub>	Unit			
Spontaneous Control(MNNG)		0.656±0.01 1.300±0.01	21.9 43.3	0.457±0.01 0.456±0.01	15.2 15.2	1.43 2.85	1.00 1.99	
50	Raw anchovy	MeOH ext.	1.191±0.01	39.7	0.449±0.01	15.0	2.65	1.85
		Hexane ext.	1.245±0.01	41.5	0.455±0.01	15.2	2.73	1.90
		MSF	1.083±0.01	36.1	0.433±0.01	14.4	2.50	1.74
	Raw anchovy +Chunil salt <sup>1)</sup>	MeOH ext.	1.288±0.01	42.9	0.429±0.01	14.3	3.04	2.13
		Hexane ext.	1.207±0.01	47.0	0.442±0.01	14.7	2.73	1.90
		MSF	1.339±0.01	44.6	0.421±0.01	14.0	3.18	2.22
	Chunil salt <sup>2)</sup> 12 months FAJ <sup>3)</sup>	MeOH ext.	1.478±0.01	49.3	0.525±0.01	17.5	2.82	1.97
		MSF	1.237±0.01	41.2	0.477±0.01	15.9	2.59	1.81
		MSF	1.340±0.01	44.7	0.483±0.01	16.1	2.77	1.93
100	Raw anchovy	MeOH ext.	1.077±0.01	35.9	0.445±0.01	14.8	2.42	1.69
		Hexane ext.	1.151±0.01	38.4	0.460±0.01	15.3	2.50	1.75
		MSF	1.017±0.01	33.9	0.440±0.01	14.7	2.31	1.61
	Raw anchovy +Chunil salt	MeOH ext.	1.414±0.01	47.1	0.446±0.01	14.9	3.17	2.21
		Hexane ext.	1.175±0.01	39.2	0.445±0.01	14.9	2.64	1.85
		MSF	1.464±0.01	59.4	0.447±0.01	14.8	3.27	2.29
	Chunil salt <sup>4)</sup> 12 months FAJ	MeOH ext.	1.600±0.05	53.3	0.543±0.01	18.1	2.95	2.06
		MSF	1.265±0.01	42.2	0.483±0.01	16.1	2.61	1.83
		MSF	1.412±0.01	47.1	0.500±0.01	16.7	2.82	1.97

<sup>1)</sup>Raw anchovy : salt = 80 : 20, <sup>2)</sup>25 μg/well, <sup>3)</sup>Fermented anchovy juice, <sup>4)</sup>50 μg/well.

시 메탄올추출물은 항돌연변이 효과를 나타낸 반면 MSF는 항돌연변이 효과를 나타내지 못했다. 따라서 멸치젓갈 제조시 멸치에 소금이 첨가되어(생

젓갈) 돌연변이 유발이 일어날 수 있지만 숙성기간이 길어지면(12개월, 익은 젓갈) 오히려 항돌연변이 효과가 있는 것으로 나타났다. 충분히 발효된 젓갈은 김치

나 그의 음식물에 첨가, 사용되어도 그 안전성에는 문제가 없을 것으로 보여지며, 젓갈의 안전성과 기능성에 관한 *in vivo* 실험과 hexane층 내에 존재하는 가능성 물질 및 그 기작에 대한 추가연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 요약

Ames 실험계에서 소금에 절인 생멸치는 생멸치보다 돌연변이유발성이 높았고, 잘숙성된 멸치액젓(12개월)은 6개월된 멸치젓갈보다 낮은 보돌연변이성을 나타내었다. MNNG에 의한 돌연변이 실험에서 12개월간 발효시킨 멸치액젓 2.5 mg에 함유된 천일염 1.4 mg과 histidine 8 µg은 12개월간 발효시킨 멸치액젓보다 2배 이상 높은 보돌연변이성을 보였다. 따라서 histidine의 함량이 높은 멸치젓갈의 안전성을 Ames test로 판정하는 것은 바람직하지 못한 것으로 나타났다. 반면 SOS 실험계에서 생멸치, 소금에 절인 생멸치와 발효된 멸치젓갈 자체는 돌연변이유발성이 없었고, 오히려 12개월된 젓갈은 6개월된 젓갈보다 높은 항돌연변이성을 보였다. 따라서 멸치젓갈 제조시 멸치에 소금이 첨가되어(생젓갈) 돌연변이 유발이 일어날 수 있지만 숙성기간이 길어지면(12개월, 익은 젓갈) 항돌연변이 효과가 있는 것으로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구결과에 의한 것으로 연구지원에 감사드립니다.

## 문헌

- Lee, E.H. Fish and shellfish. Cumulative Review of the Literatures on Korean Foods(2), Kor. Soc. Food Sci. Technol. p.2199 (1977)
- Yoon, S.J. Fermented foods in Korea(theory & practice). Shin-Kwang Publishing Co., p.128 (1997)
- Park, C.K. Extractive nitrogenous constituents of anchovy sauce and their quality standardization.

- Korean J. Food Sci. Technol. 27: 471-477 (1995)
- Lee, J.S. Determination of volatile nitrosamines from fermented anchovy sauce. Korean J. Food Sci. Technol. 14: 184-186 (1982)
- Chung, C.S. Changes of nonvolatile amines and mutagenicity during fermentation of anchovy, M.S. Thesis, Kyungsung University (1989)
- Kim, S.H., Hyon, J.S., Oh, C.K., Oh, M.C., Park, C.S. and Kang, S.B. Changes of secondary, tertiary amines and quarternary ammonium compounds, and formation of N-nitrosamine during fermentation of kimchi with anchovy sauce. J. Kor. Soc. Food Nutr. 23: 704-710 (1994)
- Kim, S.H., Lee, E.H., Kawabata, T., Ishibashi, T., Endo, T. and Matsui, M. Possibility of N-nitrosamine formation during fermentation of kimchi. J. Kor. Soc. Food Nutr. 13: 291-306 (1984)
- Choe, S.M. Changes in the contents of nitrate and nitrite, and formation of N-nitrosodimethylamine during kimchi fermentation. M.S. Thesis, Pusan National University (1991)
- Park, K.Y. and Cheigh, H.S. Kimchi and nitrosamines. J. Kor. Soc. Food Nutr. 21: 109-116 (1992)
- Park, K.Y. The nutritional evaluation and antimutagenic and anticancer effects of Kimchi. J. Kor. Soc. Food Nutr. 24: 169-182 (1995)
- Park, K.Y. Antimutagenic and anticancer functions of kimchi. Proceedings of IUFOST '96 Regional Symposium on Non-nutritive Health Factors for Future Foods, p.139-166 (1996)
- Maron, D.M. and Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215 (1983)
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31: 347-364 (1975)
- Baik, C.W. and Ham, S.S. Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple by using SOS chromotest. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 618-624 (1990)
- Miller, J. Experiments in molecular genetics. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1972)
- Lee, H.J. Effects of fermented anchovy extract on the artificial mutation in *Drosophila*. M.S. Thesis, Pusan National University (2000)