

## 재래식 버섯균사체 된장의 항종양성과 항돌연변이성

김석중 · 박철우 · 박숙자 · 김영숙 · 조현종\* · 임동길\*\* · 김정옥\*\*\* · 이주희\*\*\*\* · 하영래†

경상대학교 응용생명과학부, \*농협중앙회 식품연구소, \*\*부산지방식품의약품안전청,

\*\*\* (주) HK바이오텍, \*\*\*\*경상대학교 식품영양학과

### Enhanced Antitumorigenicity and Antimutagenicity of *Doenjang* Prepared from Mushroom Mycelia-cultured Traditional *Mejus*

Seck-Jong Kim, Cherl-Woo Park, Sook-Jahr Park, Young-Suk Kim, Hyun-Jong Cho\*,  
Dong-Kil Lim\*\*, Jeong-Ok Kim\*\*\*, Joo-Hee Lee\*\*\*\* and Yeong-Lae Ha†

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

\*National Agricultural Cooperative Federation, Seoul 100-707, Korea

\*\*Busan Regional KFDA, Busan 608-080, Korea

\*\*\*HK Biotech Co., Ltd, Jinju 660-932, Korea

\*\*\*\*Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

#### Abstract

Antitumorigenic and antimutagenic activities of the *doenjangs* prepared from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus* (designated to MTDJ) were investigated using the model of Sarcoma-180-induced mouse ascites cancer, and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)-mediated *S. typhimurium* mutagenicity, respectively. Antioxidative activity of MTDJ was also investigated using the mouse liver microsomal system. Mushroom stains used for the preparation of the mushroom mycelia-cultured traditional *mejus* were Synryeong (*Agaricus blazei*), Yeonggi (*Ganoderma lucidum*), Sanghwang (*Phellinus linteus*), and Neutari (*Pleurotus ostreatus*). All MTDJs showed the enhanced antitumorigenicities (12% by Synryeong, 13% by Sanghwang, 16% by Yeonggi, and 19% by Neutari), antimutagenicity (6.1~20.8% for IQ and 3.1~10.2% for AFB<sub>1</sub>), and antioxidative activity (6.6~46.5%), relative to the control *doenjang*. The  $\beta$ -D-glucan content (0.75~1.71 mg/g) of MTDJs was 3~8 times higher than that (0.22 mg/g) of the control *doenjang*. Genistein content (769~932  $\mu$ g/g) of MTDJs was also higher than that (728  $\mu$ g/g) of control *doenjang*. The content of  $\beta$ -D-glucan and genistein was not exactly correlated to the antitumorigenicity and antimutagenicity of MTDJs. These results indicate that antitumorigenicity and antimutagenicity of MTDJs were elevated in comparison with the control *doenjang*, and the observed functions were, in part, derived from  $\beta$ -glucan and/or genistein in the MTDJs.

**Key words:** mushroom mycelia-cultured traditional *doenjang*, antitumorigenicity, antimutagenicity

#### 서론

콩을 원료로 제조한 재래식 된장은 flavonoid, 갈변물질 등과 같은 성분을 함유하고 있어 항산화성은 강하지만 항종양성이 약한 것으로 알려져 있다(1-5). 따라서 국민 건강증진을 위해 항암효과 및 항돌연변이성효과가 증가된 재래식된장의 개발이 필요하다.

한국인의 암 발생율이 매년 증가하고 있는 추세로 우리나라 국민이 즐겨먹는 음식 중의 하나인 된장의 항종양성 증가가 필요하다. 숯불로 고기를 굽을 때 돌연변이성/종양성 물질인 heterocyclic amines이 생성된다(6,7). 우리나라 사람은 숯불구이를 좋아하고 이때 된장을 곁들여 먹는 식생활 습관이 있다. 따라서 이들 heterocyclic amine의 활성을 감소시킬

수 있는 된장을 개발하는 것은 국민의 건강증진을 위해 바람직하다고 할 수 있다.

버섯균사체는 항암효과, 면역증강효과, 항산화효과, 혈중 콜레스테롤저하 등의 기능성이 있는 것으로 알려져 있다(8-11). 이들의 효과를 위해 된장에 버섯균사체를 첨가하는 것은 가능하다. 그러나 재래식 버섯균사체 발효메주를 제조한 다음 버섯균사체된장을 제조할 경우, 버섯균사체가 메주에 생육하면서 또는 된장을 숙성하는 과정 중에서 버섯균사체 자체가 가지고 있는 것 외의 여러 가지 기능성 성분을 된장에 부여 할 것이다. 예를 들면 버섯균사체가 생육을 하면서 여러 가지 효소를 분비하여 그들이 기능성이 약한 물질을 기능성이 강한 물질로 변화시킬 수도 있으며,  $\beta$ -glucan과 같은 물질도 된장에 부여할 것이다. 따라서 재래식 버섯균사체메주를

†Corresponding author. E-mail: ylha@nongae.gsnu.ac.kr  
Phone: 82-55-751-5471. Fax: 82-55-757-0178

제조한 후 이로부터 재래식 버섯균사체된장을 제조하는 것이 항종양성 및 항돌연변이성을 증가시킬 수 있는 가장 좋은 방법이 될 것이다.

전보에서 본 연구진은 기능성을 강화시킬 수 있는 재래식 버섯균사체메주를 생산하는 방법을 개발하였다(12). 따라서 본 연구에서는 재래식 버섯균사체메주로부터 재래식 버섯균사체된장을 제조하여 이들의 항종양성 및 항돌연변이성을 조사하였다. 또한 항종양성과 밀접한 관계가 있는 항산화성도 조사하였으며, 이들 기능성에 관련되는 화학성분 함량을 분석하여 대조된장의 함량과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

원료대두는 시판 메주제조용을 구입하여 사용하였고, 신태버섯(AB; *Agaricus blazei*), 영지버섯(GL; *Ganoderma lucidum*), 상황버섯(PL; *Phellinus linteus*) 및 느타리버섯(PO; *Pleurotus ostreatus*)균은 (주)HK바이오텍에서 보관 중인 균주를 사용하였다. 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ), aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)은 Aldrich사(Milwaukee, WI), ferrous ammonium sulfate(Fe<sup>2+</sup>), NADPH, ascorbate-Na(Asc-Na), 2,2'-azo-bis(isobutyronitrile)(ABIN), cumene hydroperoxide(CuOOH), genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone), daidzein(4',7-dihydroxyisoflavone)은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 그 외 사용된 모든 시약은 특급 시약 내지 1급 이상이였다.

### 버섯균사체 재래식 된장의 제조

버섯균사체 재래식 메주는 전보 Kim 등(12)의 방법에 준하여 제조한 것을 된장의 제조에 사용하였다. 버섯균사체된장은 버섯균사체 재래식 메주를 3배량의 18% 소금물에 60일간 침지하여 숙성시킨 후 고형물을 분리한 다음 용기에 담아 상온에서 1개월 동안 숙성시켜 제조하였다.

### Mouse 복수암에 대한 항종양성

Female ICR mouse는 β-chip이 깔린 polycarbonate cage (5 mice/cage)에서 mouse용 pellet 사료로 1주일동안 예비 사육하여 체중이 24±1 g인 것을 사용하였다. 물과 사료를 자유롭게 먹도록 하였고, 조명은 12시간 간격의 light-and-dark cycle을 유지하여 자연조명에 가깝게 하였으며, 사육실의 온도는 20±1°C, 습도는 60%로 조절하였다. 항복수암용 시료는 버섯균사체된장을 5배(w/v)의 acetone:methanol(1:1, v/v) 용매로 추출한 후 감압농축하여 시료로 사용하였다. Mouse 복수암에 대한 항종양성 실험은 Bahn 등(13)의 방법에 의해서 Sarcoma-180(S-180) 세포에 potassium phosphate saline (PBS)용액을 가하여 조제한 세포 부유액(1×10<sup>7</sup> cell/mL) 0.1 mL을 mouse의 복강에 주사하여 복수암을 유발하였다. 처리당 10마리의 mouse를 사용하였으며, 복수암 유발

후 매일(10일간) 조제한 시료(400 µg/g body weight) 0.1 mL를 mouse의 복강에 주사하였다. Control mouse는 PBS만 0.1 mL 투여하였다. S-180 세포를 복강에 투여한 후, 3일간격으로 mouse의 무게와 사료 섭취량을 42일 동안 조사하여 생존한 mouse의 수와 생존일수를 조사하였다.

### 항돌연변이성 효과

상기 항종양성 실험에서 조제한 시료의 IQ 및 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이성은 *S. typhimurium* TA 98과 100을 사용하여 Maron과 Ames(14)의 방법에 준하여 측정하였다. *S. typhimurium* TA98 [일본 Kikkoman 회사에서 분양 받아 genotype (*rfa* mutation, ampicillin resistance, histidine requirement) 시험에서 이상이 없음을 확인한 후 사용]을 이용하였고, S9-cofactor mixture는 Arochlor1254를 Sprague Dawley rat에 몸무게 kg당 500 mg을 주사하여 얻은 간으로부터 조제한 S9를 cofactor mixture(1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 12 mM EDTA, 200 mM glucose-6-phosphate, 16.2 mM NADP)에 대해 5% 첨가하여 조제하였다. 실험은 ice bath 상에서 S9-cofactor mixture 0.5 mL, 12시간 배양된 균액(1~2×10<sup>9</sup> cells/mL) 0.1 mL, 시료(200 µg/50 mg DMSO) 50 µL과 돌연 변이성 물질을 녹인 DMSO 50 µL를 첨가하고 혼합한 후 진탕 배양(37°C, 150 rpm, 30 min)하고 여기에 45°C water bath에 보관 중인 top agar(histidine과 biotin을 각각 0.5 mM 함유한 용액을 10% 함유함) 2 mL를 가하여 minimal glucose agar plate에 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양한 후 revertants 수를 계산하여 돌연변이성을 측정하였다.

### 항산화성 효과

상기 항종양성 실험에서 조제한 시료(100 mg/0.2 mL PBS), butylated hydroxy toluene(BHT, 5 mg/0.2 mL PBS)을 매일 0.2 mL를 10일 동안 female ICR mouse에 경구 투여하였다 (동물사육은 복수암 실험과 동일). 대조구는 PBS만을 경구 투여하였다. 시료 처리 2주 후 mouse를 희생하여 간을 적출하고 microsome을 분리하였다(15). Microsome에 산화유도 물질(NADPH/Fe<sup>2+</sup>, Asc-Na/Fe<sup>2+</sup>, CuOOH, ABIN)을 처리하여 항산화 효과를 Kim 등(16)의 방법으로 측정하였다.

### 화학성분 함량의 분석

**β-D-glucan** : 버섯균사체된장(50 g)에 함유된 β-D-glucan은 Aman과 Graham의 방법(17)에 준하여 추출하였다. 이 추출물에 3배의 ethanol(1:3, w/v)을 가하여 혼합하고, 4°C에서 24시간 동안 β-D-glucan을 침전시키고, 건조(80°C)하였다. 이 건조물을 페놀황산법으로 환원당 함량을 측정(470 nm)하여 정량 β-D-glucan 함량으로 환산하였다.

### 페놀화합물과 isoflavone

**시료의 추출** : 버섯균사체된장(40 g)을 균질화(200 mL 메탄올), 가열(5분), 여과를 2회 반복하여 회수한 여액을 40°C에

서 진공농축하였다. 이 농축액에 함유된 지방을 hexane으로 제거한 다음 시료로 사용하였다.

**총 페놀 함량분석** : 총 페놀의 함량은 Hammerschmidt와 Pratt의 방법(18)에 준하여 페놀화합물을 정량하였다. 즉 추출한 시료에 2% 탄산나트륨용액 2 mL를 혼합하여 2분간 방치하였다. 여기에 50% Folin-Ciocalteu시약 0.1 mL를 첨가하여 30분간 실온에 방치한 다음 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Chlorogenic acid를 표준물질로 사용하였다.

**Isoflavone** : Isoflavone의 함량은 시료 1 g에 1 N HCl 3 mL를 가하여 1시간 동안 환류냉각하여 분해한 다음, methanol 15 mL를 첨가하였다. 이 추출액을 냉장고에서 1일 정치 후 상징액을 취해서 membrane filter(0.22 µm)로 여과한 다음 µ-LUNA C<sub>18</sub> column이 장착된 HPLC(Young-Lin M-930, Korea)로 genistein과 daidzein을 분석하였다. 이때 사용한 용매는 methanol : 1 mM ammonium acetate(6 : 4, v/v)를 1 mL/min의 flow rate로 분석하였으며, 255 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

Mouse 복수암에 대한 항종양성

복수암 세포 S-180 cell을 mouse의 복강에 투여하여 복수암을 유발한 mouse에 대한 버섯균사체된장 추출물(400 µg/g mouse/0.1 mL PBS)의 평균 생존일 및 생존율을 Table 1에 나타내었다. 된장추출물을 처리하지 않은 무처리 mouse의 평균수명은 21.8일이었고, 대조된장을 처리한 mouse의 평균

Table 1. Effects of *doenjangs* from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus* on mouse ascites tumorigenesis induced by S-180 cells

Treatment <sup>1)</sup>	Mean survival day <sup>2)</sup>	Survival rate <sup>3)</sup>	Survived mouse <sup>4)</sup>
Normal <sup>5)</sup>	21.8	100	0/10
Control <sup>6)</sup>	24.3	111(100)	0/10
Synryeong <sup>7)</sup>	27.3	125(112)	0/10
Yeonggi	28.3	130(116)	1/10
Sanghwang	27.4	126(113)	0/10
Neutari	29.0	133(119)	1/10

<sup>1)</sup>Each treatment was consisted of 10 mice. Each mouse was given 400 µg sample/g mouse/0.1 mL PBS. Control mice were given only 0.1 mL PBS.

<sup>2)</sup>Mean survival days of mouse until 42 days after treatment.

<sup>3)</sup>Survival rate = [mean survival days of treatment mice/mean survival day of control mice] × 100. The number in the parenthesis means the percentage against control.

<sup>4)</sup>Numbers of mouse survived until 42 days after treatment.

<sup>5)</sup>Treatment without sample.

<sup>6)</sup>Control *doenjang* prepared from *meju* fermented without inoculation of mushroom mycelia.

<sup>7)</sup>*Doenjang* sample from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*: Synryeong, *Agaricus blazei*; Yeonggi, *Ganoderma lucidum*; Sanghwang, *Phellinus linteus*; and Neutari, *Pleurotus ostreatus*.

수명은 24.3일로 무처리에 비해 11% 연장되었다. 신령, 영지, 상황 및 느타리버섯균사체된장을 처리한 mouse의 평균수명은 각각 27.3, 28.3, 27.4 및 29.0일로 무처리에 비해서는 각각 25, 30, 26, 33%, 대조된장에 비해서는 각각 12, 16, 13, 19% 평균수명이 연장되었다.

항산화 효과

버섯균사체된장 추출물(100 mg)을 mouse에 경구투여하여 얻은 liver microsome에 산화유도물질 Asc/Fe<sup>2+</sup>, NADPH/Fe<sup>2+</sup>, ABIN, CuOOH로 산화를 유도하여 생성되는 malonaldehyde(MA)의 함량을 조사하였다(Table 2). 버섯균사체된장은 산화유도물질에 관계없이 시료를 처리하지 않은 무처리에 비교하여 유의성있게 산화를 억제하였으나 BHT의 항산화력보다 낮았다. 산화유도물질 중 Asc/Fe<sup>2+</sup> system에서는 느타리버섯균사체된장이, NADPH/Fe<sup>2+</sup> system에서는 신령버섯균사체된장이 대조된장에 비해 유의적으로 항산화성이 높았다. 또한 ABIN이나 CuOOH으로 산화를 유도했을 경우에는 신령버섯균사체된장이 대조된장보다 유의적으로 항산화성이 높았다.

항돌연변이성 효과

Table 3은 버섯균사체된장 추출물(200 µg)의 *S. typhimurium* TA 98에서 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이성을 나타내고 있다. IQ(0.02 µg)는 1,654개의 revertant, AFB<sub>1</sub>(1 µg)은 1,220개의 revertant를 보였다. 이에 대해 대조된장 추출물은 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 의해 생성되는 revertant수를 각각 1,125(32%)와 815(33%)로 감소시켰다. 또한 신령, 영지, 상황, 느타리버섯균사체된장 추출물 200 µg은 IQ의 revertant 수를 각각 912(45%), 891(46%), 897(46%), 998(40%)로 감소시켰고, AFB<sub>1</sub>의 revertant 수를 각각 736(40%), 754(38%), 757(38%), 736(40%)로 감소시켰다. 버섯균사체된장의 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이성은 대조된장에 비해 각각 11~21%, 7~10% 증가되었다. 그 증가된 정도는 작았지만 신령버섯균사체된장의 항돌연변이성이 가장 높았다.

Table 4는 버섯균사체된장 추출물(200 µg)의 *S. typhimurium* TA 100에서 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이성을 나타내고 있다. IQ(0.02 µg)는 1,424개의 revertant, AFB<sub>1</sub>(1 µg)은 1,073개의 revertant를 보였다. 이는 Lee 등(19)의 *S. typhimurium* TA 98, 100에서 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 대한 revertant와 유사한 결과였다. 대조된장 추출물은 IQ와 AFB<sub>1</sub>의 revertant수를 각각 1,033(28%)와 832(23%)로 감소시켰다. 반면에 신령, 영지, 상황, 느타리버섯균사체된장 추출물은 IQ의 revertant 수를 각각 970(32%), 956(33%), 953(33%), 917(36%)로 감소시켰고, AFB<sub>1</sub>의 revertant 수를 각각 780(27%), 806(25%), 747(30%), 755(30%)로 감소시켰다. 버섯균사체된장의 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이성은 대조된장에 비해 각각 6~11%, 3~10% 증가되었다. 그 증가된 정도는 작았지만 느타리버섯균사체된장의 항돌연변이성이 가장 높았다.

**Table 2. Reduction of the lipid peroxidation of mouse liver microsomes derived from mice treated with *doenjangs* from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus***

Treatment	MA (nmol/min/g protein) induced by			
	Asc-Na/Fe <sup>2+</sup>	NADPH/Fe <sup>2+</sup>	ABIN	CuOOH
Normal <sup>1)</sup>	0.1680 <sup>a2)</sup>	0.1410 <sup>a</sup>	0.7060 <sup>a</sup>	0.8734 <sup>a</sup>
BHT	0.0520 <sup>d</sup>	0.0687 <sup>bc</sup>	0.4040 <sup>c</sup>	0.5470 <sup>c</sup>
Control <sup>3)</sup>	0.1500 <sup>ab</sup>	0.0916 <sup>b</sup>	0.6400 <sup>ab</sup>	0.8300 <sup>ab</sup>
Synryeong <sup>4)</sup>	0.1233 <sup>bc</sup> (17.8) <sup>5)</sup>	0.0490 <sup>c</sup> (46.5)	0.4800 <sup>bc</sup> (25.0)	0.6440 <sup>bc</sup> (22.4)
Yeonggi	0.1220 <sup>bc</sup> (18.7)	0.0640 <sup>bc</sup> (30.1)	0.5200 <sup>cd</sup> (18.8)	0.6920 <sup>cd</sup> (16.6)
Sanghwang	0.1200 <sup>bc</sup> (20.0)	0.0670 <sup>bc</sup> (26.9)	0.5720 <sup>bc</sup> (10.6)	0.7380 <sup>bcd</sup> (11.1)
Neutari	0.1140 <sup>c</sup> (24.0)	0.0780 <sup>bc</sup> (14.8)	0.5380 <sup>cd</sup> (15.9)	0.7750 <sup>abc</sup> (6.6)

<sup>1)</sup>Treatment without sample.<sup>2)</sup>Means with same superscript small letters are not significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple test.<sup>3)</sup>Control *doenjang* prepared from *meju* fermented without inoculation of mushroom mycelia.<sup>4)</sup>*Doenjang* sample from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*: Synryeong, *Agaricus blazei*; Yeonggi, *Ganoderma lucidum*; Sanghwang, *Phellinus linteus*; and Neutari, *Pleurotus ostreatus*.<sup>5)</sup>The number in the parenthesis means the percentage against control.**Table 3. Reduction of the mutagenicity of IQ and AFB<sub>1</sub> for *S. typhimurium* TA 98 by *doenjangs* from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus***

Treatment	IQ <sup>1)</sup>		AFB <sub>1</sub> <sup>2)</sup>	
	Revertant/ plate	Inhibition (%)	Revertant/ plate	Inhibition (%)
Normal <sup>3)</sup>	1,654 ± 78 <sup>a4)</sup>	0.0	1,220 ± 19 <sup>a</sup>	0.0
Control <sup>5)</sup>	1,125 ± 65 <sup>b</sup>	32.0	815 ± 25 <sup>b</sup>	33.2
Synryeong <sup>6)</sup>	912 ± 51 <sup>c</sup>	44.9(18.9) <sup>7)</sup>	736 ± 63 <sup>b</sup>	39.7(9.7)
Yeonggi	891 ± 40 <sup>c</sup>	46.1(20.8)	754 ± 47 <sup>b</sup>	38.2(7.5)
Sanghwang	897 ± 56 <sup>c</sup>	45.8(20.3)	757 ± 17 <sup>b</sup>	38.0(7.1)
Neutari	998 ± 45 <sup>c</sup>	39.7(11.3)	736 ± 79 <sup>b</sup>	39.7(9.7)

<sup>1)</sup>Each plate contained 0.02 µg IQ and/or 200 µg sample of *doenjang* dissolved in 50 µL DMSO.<sup>2)</sup>Each plate contained 1 µg AFB<sub>1</sub> and/or 200 µg sample of *doenjang* dissolved in 50 µL DMSO.<sup>3)</sup>Treatment without sample.<sup>4)</sup>Means ± SD of triplication was obtained by subtraction of spontaneous revertants 22 ± 4 for IQ and 21 ± 3 for AFB<sub>1</sub>. Means with same superscript small letters are not significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple test.<sup>5)</sup>Control *doenjang* prepared from *meju* fermented without inoculation of mushroom mycelia.<sup>6)</sup>*Doenjang* sample from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*: Synryeong, *Agaricus blazei*; Yeonggi, *Ganoderma lucidum*; Sanghwang, *Phellinus linteus*; and Neutari, *Pleurotus ostreatus*.<sup>7)</sup>The number in the parenthesis means the percentage against control.

### 화합성분

버섯균사체와 관련되거나 된장과 관련되어 항종양성 또는 항산화성과 관련이 있는 β-D-glucan 및 phenol성 화합물을 버섯균사체된장으로부터 정량하였다(Table 5). β-D-glucan의 함량은 대조된장에서 0.22 mg/g이었으나 상황, 신령, 영지, 느타리버섯균사체된장에서는 각각 1.71, 1.59, 0.84, 0.75 mg/g으로 대조된장보다 3~8배정도 높았다( $p < 0.05$ ).

총 페놀성 화합물은 대조된장에서는 6.8 mg/g이었으나 느타리, 신령, 상황, 영지버섯균사체된장에는 7.8, 6.9, 6.2, 5.9 mg/g으로 신령 외에 다른 버섯균사체된장은 대조된장에 대

**Table 4. Reduction of the mutagenicity of IQ and AFB<sub>1</sub> for *S. typhimurium* TA 100 by *Doenjangs* from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus***

Treatment	IQ <sup>1)</sup>		AFB <sub>1</sub> <sup>2)</sup>	
	Revertant/ plate	Inhibition (%)	Revertant/ plate	Inhibition (%)
Normal <sup>3)</sup>	1,424 ± 50 <sup>a4)</sup>	0.0	1,073 ± 58 <sup>a</sup>	0.0
Control <sup>5)</sup>	1,033 ± 52 <sup>b</sup>	27.5	832 ± 45 <sup>b</sup>	22.5
Synryeong <sup>6)</sup>	970 ± 24 <sup>bc</sup>	31.9( 6.1) <sup>7)</sup>	780 ± 36 <sup>bc</sup>	27.3( 6.3)
Yeonggi	956 ± 15 <sup>c</sup>	32.9( 7.5)	806 ± 15 <sup>b</sup>	24.9( 3.1)
Sanghwang	953 ± 37 <sup>c</sup>	33.1( 7.7)	747 ± 43 <sup>c</sup>	30.4(10.2)
Neutari	917 ± 31 <sup>c</sup>	35.6(11.2)	755 ± 32 <sup>c</sup>	29.6( 9.3)

<sup>1)</sup>Each plate contained 0.02 µg IQ and/or 200 µg sample of *doenjang* dissolved in 50 µL DMSO.<sup>2)</sup>Each plate contained 1 µg AFB<sub>1</sub> and/or 200 µg sample of *doenjang* dissolved in 50 µL DMSO.<sup>3)</sup>Treatment without sample.<sup>4)</sup>Means ± SD of triplication was obtained by subtraction of spontaneous revertants 98 ± 5 for IQ and 101 ± 3 for AFB<sub>1</sub>. Means with same superscript small letters are not significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple test.<sup>5)</sup>Control *doenjang* prepared from *meju* fermented without inoculation of mushroom mycelia.<sup>6)</sup>*Doenjang* sample from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*: Synryeong, *Agaricus blazei*; Yeonggi, *Ganoderma lucidum*; Sanghwang, *Phellinus linteus*; and Neutari, *Pleurotus ostreatus*.<sup>7)</sup>The number in the parenthesis means the percentage against control.

해 유의적인 차이를 나타내었다. 이소플라본의 함량(daidzein 과 genistein)은 대조된장에서는 1,539 µg/g이었고, 신령, 느타리, 상황, 영지버섯균사체된장에서는 각각 1,584, 1,464, 1,427, 1,394 µg/g으로 대조된장의 함량과 비교하여 영지를 제외한 다른 버섯균사체된장은 유의적인 차이가 없었다. Daidzein의 함량은 대조된장에서 811 µg/g이었으나, 느타리, 상황, 신령, 영지버섯균사체된장 순으로 674, 658, 652, 618 µg/g으로 유의적으로 낮았다. 그러나 genistein의 함량은 대조된장의 728 µg/g에 비해 신령, 느타리, 영지, 상황버섯균사체된장은 932, 790, 776, 769 µg/g으로 대조된장보다 유의적으로 높았다.

Table 5. Contents of  $\beta$ -D-glucan and phenolic compounds in *doenjangs* from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*

Treatment	$\beta$ -Glucan (mg/g)	Chlorogenic acid equivalent (mg/g)	Isoflavone ( $\mu$ g/g)		
			Daidzein	Genistein	Total
Control <sup>1)</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>d2)</sup>	6.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	811 $\pm$ 45 <sup>a</sup>	728 $\pm$ 27 <sup>c</sup>	1,539 <sup>a</sup>
Synryeong <sup>3)</sup>	1.59 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	6.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	652 $\pm$ 32 <sup>b</sup>	932 $\pm$ 46 <sup>a</sup>	1,584 <sup>a</sup>
Yeonggi	0.84 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	5.9 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	618 $\pm$ 30 <sup>b</sup>	776 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	1,394 <sup>b</sup>
Sanghwang	1.71 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	6.2 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	658 $\pm$ 55 <sup>b</sup>	769 $\pm$ 33 <sup>bc</sup>	1,427 <sup>ab</sup>
Neutari	0.75 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	7.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	674 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	790 $\pm$ 31 <sup>b</sup>	1,464 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Control *doenjang* prepared from *meju* fermented without inoculation of mushroom mycelia.

<sup>2)</sup>Average of three experimental data. Means with same superscript small letters are not significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple test.

<sup>3)</sup>*Doenjang* sample from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*: Synryeong, *Agaricus blazei*; Yeonggi, *Ganoderma lucidum*; Sanghwang, *Phellinus linteus*; and Neutari, *Pleurotus ostreatus*.

## 고 찰

본 연구에서는 전보(12)에서 제조한 재래식 버섯균사체 메주로부터 재래식 버섯균사체(신령, 영지, 상황, 느타리)된장을 제조하여 이들 된장의 항종양성 및 항돌연변이성에 관한 연구를 수행하였다. 이들 버섯균사체된장은 S-180 cell로 유발한 mouse 복수암을 대조(무처리)에 비해 25~33% 수명을 연장하였고, 대조된장에 비해 12~19%의 항종양성이 증가되었다(대조된장도 11%의 수명을 연장하였다)(Table 1). 또한 이들 버섯균사체된장은 항돌연변이성 효과(IQ, 32~46%; AFB<sub>1</sub>, 25~40%)를 가지고 있었고, 대조된장에 비해 IQ에 대해 6~21%, AFB<sub>1</sub>에 대해 3~10%의 증강된 항돌연변이성을 나타내었다(대조된장도 IQ에 대해 28~32%, AFB<sub>1</sub>에 대해 23~33%의 항돌연변이성을 나타내었다)(Table 3,4).

대조된장에 비해 버섯균사체된장의 항종양성 증강에 관한 이유는 현재의 연구에서 정확하게 파악할 수 없다. 그러나 버섯균사체가 재래식 메주에 생육하면서 특징적인 성분을 생산하거나(예를 들면  $\beta$ -D-glucan), 메주성분을 분해하여 항종양성이 강한 물질로 전환하기 때문인 것이다. 또한 많은 항산화성 물질이 항종양성 역할을 하기 때문에(20), 버섯균사체된장의 항산화성(Table 2)이 항종양성 증강에 하나의 인자로 작용할 수 있을 것이다.

버섯자실체나 버섯균사체배양시에 함유된  $\beta$ -D-glucan은  $\beta$ -1,3-결합을 주쇄로 하여  $\beta$ -1,6-결합이 함유된 다당류가 풍부하게 존재하고 이들 glucan은 면역기능을 활성화하여 S-180 cell로 유발한 mouse 복수암을 강하게 억제한다고 보고되었다(8,21). 따라서 버섯균사체된장에는  $\beta$ -D-glucan의 함량이 0.75~1.71 mg/g으로 대조된장(0.22 mg/g)보다 3~8배 정도 높았다(Table 5). 따라서 이 증가된  $\beta$ -D-glucan이 버섯균사체된장의 항종양효과에 기인할 것으로 생각된다.

메주의 발효나 된장의 숙성 중에 생성되는 갈변물질 및 phenolic 화합물이 항산화성 또는 항종양성의 효과를 나타낸다고 보고되었다(1-3). 물론 이들도 된장의 항종양성이나 항산화성에 영향을 미치겠지만, 버섯균사체된장이 대조된장에 비해 항종양성이 증가된 것은 총 isoflavone이나 총 phenolic 화합물보다 여러 모델에서 항종양성을 지닌 genistein의 함

량(버섯균사체된장, 769~932  $\mu$ g/g; 대조된장, 728  $\mu$ g/g)과 관계가 있을 것이다. Kim과 Yoon(22)은 일반 발효된장에 530  $\mu$ g/g의 genistein이 함유되어 있다고 보고한 결과보다 약간 높은 수치를 나타내었다. 버섯균사체된장에 genistein의 함량이 증가하고 daidzein의 함량이 감소한 것은 버섯균사체의 작용에 의하여 daidzein이 genistein으로 전환된 것으로 생각된다. 그러나 미생물의 종류나 발효속성에 따른 차이에 의해 daidzein과 genistein 함량 및 비율상의 차이가 생길 수 있고(22), 주로 원료에 함유된 당이 genistein과 반응하여 conjugate를 형성함으로써 검출량이 실제량보다 감소할 수 있다고 함으로 isoflavone 총량에 대한 더욱 상세한 연구가 요망된다.

대두로 제조된 발효식품 중에서 된장에는 항돌연변이성 효과가 있음이 보고되었다(23). 이들 중에는 재래식 된장이 다른 된장(청국장, 일본된장 등)보다 항돌연변이성이 강하다고 보고되었는데 이는 주로 된장의 발효 및 숙성과정 중 콩으로부터 유래된 물질로(23). 된장 중에 존재하는 미생물(24)이 관여된다고 보고하였다. 또한 먹물버섯(*Coprinus comatus*) 균사체 추출물이 AFB<sub>1</sub>에(25), 신령버섯(26) 및 상황버섯(27) 추출물의 항돌연변이성 효과도 보고된 바 있다. 이들 결과는 버섯 그 자체도 항돌연변이성을 가짐은 물론 발효된장도 항돌연변이성을 가짐을 의미한다. 본 연구에서 제조한 버섯균사체된장은 25~46%의 항돌연변이성을 보였는데 반해 대조된장은 23~33% 항돌연변이성을 보여 이 결과는 버섯균사체와 발효된장의 시너지효과를 보여 주고 있다. 버섯균사체된장의 항돌연변이성에는 phenolic 화합물 등 다양한 화합물이 관여한다고 생각된다.

본 연구에서 정량한 성분만으로 비교하여 볼 때, 항종양성이 25, 26% 증가한 신령, 상황버섯균사체된장에서 각각 genistein과  $\beta$ -glucan의 함량이 가장 높았고, 33% 증가한 느타리버섯균사체된장에서 가장 낮은  $\beta$ -glucan 함량이 검출되어 이들 성분만으로 항종양성과의 상관관계를 결론 내리기 어렵다. 이러한 결과는 항산화성 및 항돌연변이성에서도 볼 수 있었다. 따라서 버섯균사체된장의 항종양성 및 항돌연변이성에는 여러 가지 성분이 복잡하게 관여하는 것으로 생각된다.

버섯균사체된장의 특성으로 생각되는 것은 대조된장에 비

해 항종양성, 항산화성 및 항돌연변이성이 증가하였으나, 버섯균사체(신령, 영지, 상황, 느타리)된장간의 이와 같은 특성 증가는 비슷하였다. 이들 특성을 종합적으로 검토하여 볼 때, genistein 함량과 항산화성이 가장 높고, *S. typhimurium* TA 98에 대한 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 대한 항돌연변이성이 높은 신령버섯균사체된장이 가장 양호한 것으로 판단되었다.

## 요 약

재래식 버섯균사체매주로부터 제조된 재래식 버섯균사체된장의 항종양성, 항산화성 및 항돌연변이성을 연구하였다. 항종양성(S-180 세포로 유발한 mouse ascites cancer)에서는 느타리, 영지, 상황, 신령버섯균사체된장이 각각 33, 30, 26, 25% 억제하여 재래식 된장(11%)에 비해 매우 우수한 항종양성을 나타내었다. 버섯균사체된장은 *S. typhimurium* TA 98에 대한 IQ와 AFB<sub>1</sub>에 의한 돌연변이성을 각각 39.7~46.1%, 38.0~39.7% 억제하여 대조된장(32.0, 33.2%)에 비해 항돌연변이성이 우수하였다. *S. typhimurium* TA 100에 대해서는 IQ와 AFB<sub>1</sub>의 돌연변이성을 각각 31.9~35.6%, 24.9~30.4% 억제하여 대조된장(27.5, 22.5%)에 비해 항돌연변이성이 좋았다. 항산화성 역시 버섯균사체된장이 대조된장에 비해 효과가 우수하였다. 관련 물질로서  $\beta$ -D-glucan 함량은 버섯균사체된장의 경우 재래식 된장에 비하여 3~8배, 총 phenolic 화합물과 isoflavone 함량은 느타리버섯균사체된장과 신령버섯균사체가 가장 높았다.

## 감사의 글

본 연구는 1999년도 농림기술개발사업(299017-2)의 연구비 지원에 의해 수행되었음을 감사 드립니다.

## 문 헌

- Kim MH, Im SS, Kim SH, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic *doenjang*: 2. Separation of lipophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 251-260.
- Lee JH, Kim MH, Im SS, Kim SH, Kim GE. 1994. Antioxidative materials in domestic *doenjang*: 3. Separation of hydrophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 604-613.
- Kim MH, Im SS, Yoo YB, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic *doenjang*: 4. Separation of phenolic compounds and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 792-798.
- Cheigh HS, Lee JS, Lee CY. 1993. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 570-575.
- Lim SY, Park KY, Rhee SH. 1999. Anticancer effect of *doenjang* in vitro sulforhodamine B (SRB) assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 240-245.
- Lee EJ, Bahn KN, Shim KH, Lee JH, Ha YL. 1995. Bacterial mutagenicity of some hot air dried shellfish and canned products of some red muscle fish during storage. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 15: 115-121.
- Wakabayashi K, Nagao M, Esumi H, Sugimura T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res* 52: 2092-2098.
- Park MH, Oh KY, Lee BW. 1998. Anti-cancer activity of *Letinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 30: 702-708.
- Kim GJ, Kim HS, Chung SY. 1992. Effects of varied mushroom on lipid compositions in dietary hypercholesterolemic rats. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 131-135.
- Lee JW, Bang KW. 2001. Biological activity of *Phellinus* spp. *Food Industry and Nutrition* 6: 25-33.
- Kim BK, Shin GG, Jeon BS, Cha JY. 2001. Cholesterol-lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 510-515.
- Kim YS, Park CW, Kim SJ, Park SJ, Ryu CH, Cho HJ, Kim JO, Lim DK, Ha YL. 2002. Preparation of mushroom mycelia-cultured traditional *meju* with enhanced anticarcinogenicity and sensory quality. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 986-993.
- Bahn KN, Lee EJ, Yang MS, Kim JO, Ha YL. 1995. Potent anticarcinogenic action of *Moutan radix* for mouse ascites cancer induced by mouse Sarcoma 180 cells. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 38: 364-369.
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-178.
- Martinez MJ, Ruiz JI, Lacort M, Ochoa B. 1991. Diurnal variations of rat liver enzymes catalyzing cholesterol ester hydrolysis. *Biochim Biophys Acta* 1085: 106-111.
- Kim HC, Park SJ, Kim JK, Park CW, Cho YU, Cho HJ, Ha YL. 2002. Effect of egg yolks from laying hens incubated astaxanthin on the oxidation of liver microsome of mouse. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 155-159.
- Aman P, Graham H. 1987. Analysis of total and insoluble mixed-linked (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -glucan in barley and oats. *J Agric Food Chem* 35: 704-709.
- Hammerschmidt PA, Pratt D. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J Food Sci* 43: 556-560.
- Lee JM, Lee EJ, Bahn KN, Kim JO, Ha YL. 1995. Potent anticarcinogenic activity of caryophyllene oxide for aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Agric Chem Biotech* 38: 468-477.
- Wattenberg LW. 1983. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res (Suppl.)* 43: 2448s-2453s.
- Rhee YK, Han MJ, Park SY, Kim DH. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus lintens*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 477-480.
- Kim JS, Yoon S. 1999. Isoflavone contents and  $\beta$ -glucosidase activities of soybean, *meju*, and *doenjang*. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1405-1409.
- Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. 1990. Antimutagenic effect of *doenjang* (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 156-162.
- Asahara N, Zhang XB, Ohta Y. 1992. Antimutagenicity and mutagen binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese miso. *J Sci Food Agric* 58: 395-399.
- Kim HJ, Lee BH, Kim OM, Bae JT, Park SH, Park DC, Lee KR. 1999. Antimutagenic effect of the fruiting body and the mycelia extracts of *Coprinus comatus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 452-457.
- Osaki Y, Kato T, Yamamoto K, Okubo J, Miyzaki T. 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycetes *Agaricus blazei*. *Jun-17. Yakugaku Zasshi* 114: 342-350.
- Ji JH, Kim MN, Chung CK, Ham SS. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 322-328.