

된장 메탄올 추출물 및 분획물에 의한 *in vitro* SOS Chromotest 실험계와 *in vivo* 초파리 돌연변이 검출계에서의 항돌연변이 효과

임선영¹ · 이숙희² · 박건영^{2*} · 윤희선³ · 이원호³

¹한국해양대학교 해양과학부

²부산대학교 식품영양학과

³부산대학교 생물학과

Inhibitory Effect of Methanol Extracts and Solvent Fractions from Doenjang on Mutagenicity Using *in vitro* SOS Chromotest and *in vivo* *Drosophila* Mutagenic System

Sun-Young Lim¹, Sook-Hee Rhee², Kun-Young Park^{2*}, Hee-Sun Yun³ and Won-Ho Lee³

¹Division of Ocean and Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Busan National University, Busan 609-735, Korea

³Dept. of Biology, Busan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

This study investigated the inhibitory effect of methanol extracts and several solvent fractions from doenjang on mutagenicity using *in vitro* SOS chromotest and *in vivo* *Drosophila* mutagenic system. In order to determine an antimutagenic effect of doenjang methanol extracts, other soybean fermented foods and original materials were compared. The treatment of doenjang methanol extracts (100 µg/assay) to SOS chromotest system inhibited N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced mutagenicity by 87~97% and showed higher antimutagenic effect than other fermented foods. Among solvent fractions from doenjang methanol extracts, the ethylacetate and dichloromethane fractions showed the stronger antimutagenic effect (91% and 95%, respectively) in SOS chromotest. In *Drosophila* mutagenic system, the treatment of ethylacetate fraction (5%/bottle) significantly inhibited aflatoxin B₁ induced mutagenicity by 97%. These results demonstrated that doenjang had an inhibitory effect to mutagenic agents in both *in vitro* and *in vivo* mutagenic systems, suggesting that its antimutagenic effect may be due to active compounds in the ethylacetate fraction from doenjang methanol extracts.

Key words: doenjang, SOS chromotest, *Drosophila* mutagenic system, antimutagenicity

서 론

된장, 간장, 고추장, 청국장 등은 우리나라의 대표적인 장류들로서 한국인의 식생활에서 없어서는 안되는 중요한 식품이며 단백질 영양원으로서 뿐만 아니라 생리활성도 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 장류의 생리활성으로는 혈압강하 효과(1), 항산화성(2,3) 및 항돌연변이성(4-6) 등이 알려져 있는데 이 중 된장에 의한 항돌연변이 효과에 대한 관심이 매우 높다.

이미 본 연구자들은 *in vitro* Ames 실험계에서 된장 메탄올 추출물은 다른 콩 관련 발효식품에 비해 항돌연변이 효과가 현저하게 높았음을 보고하였고, 마우스의 태아세포(C3H/10T1/2)에서는 발암물질로 인한 세포 독성 효과를 감소시켜 주는 활성을 나타내어 C3H 마우스에서 생성될 수 있는 발암

성을 크게 억제함을 관찰하였다(6). 또한, Choi 등(2)은 된장, 메주 및 대두의 메탄올 추출물로 본 항산화 효과는 된장 메탄올 추출물에 의한 아질산염 소거효과가 가장 높았다고 보고하였다.

본 연구에서는 된장의 항돌연변이 효과를 더욱 증명하기 위하여 *in vitro* SOS chromotest 실험계와 *in vivo* 초파리 돌연변이 검출계를 이용한 항돌연변이 실험을 도입하였다. SOS chromotest에 사용되는 *E. coli* PQ37은 frame shift 형태인 변이주와 base pair substitution 형태인 변이주형을 동시에 수행할 수 있기 때문에 여러 가지 다른 형태의 돌연변이 원 물질에 의해 유발되는 돌연변이원성을 쉽게 탐지할 수 있는 장점이 있으며, Ames test에서 밝혀진 돌연변이물질의 약 90%가 SOS 유발물질이었으며, 이 두 방법간에 정량적인 상관관계가 있다고 보고하였다(7-10). 한편, Wurgler 등(11)

*Corresponding author. E-mail: kunypark@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2839, Fax: 82-51-514-3138

에 의해 개발된 *Drosophila melanoagster*의 변이체를 이용하는 wing hairs spot 검출계인 체세포 염색체 돌연변이 검출계는 *in vivo* 항돌연변이 실험계로 널리 이용되고 있다. 이 시스템에서는 small *mwh* spots, large *mwh* spots를 계수한 정상 초파리의 강모는 한 세포 당 3개 이상의 강모를 나타내는 열성 돌연변이이고 날개 원기 세포중 결실(deletions)과 불분리 현상(nondisjunctions)이 일어난 세포는 *mwh* 세포가 1~2개로 구성된 clone인 small *mwh* spots로 검출이 되며, *mwh* 좌위와 정상 제 3염색체 사이의 체세포 염색체 재조합(miotic recombination)이나 *mwh+* 좌위에 유전자 돌연변이가 일어나면 *mwh* cell이 3개 이상으로된 clone인 large *mwh* spot으로 검출된다(12-15). 초파리를 이용한 *in vivo* 단기간 검출계는 발생단계상의 특징을 고려하여 검정하고자 하는 물질을 원하는 시기 및 처리시간을 선택적으로 조절 가능하며 이미 많은 선행 연구들에서 원핵생물인 *Salmonella*를 이용한 Ames 실험계와 진핵생물로 마우스를 이용한 발암 실험의 중간 screening계로서 두 실험계의 단점을 보완하여 줄 수 있는 것으로 평가되어지고 있다(16,17).

따라서 본 연구에서는 된장 메탄올 추출물과 이것을 더욱 분획하여 헥산, 메탄올, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물들을 얻은 후에 SOS chromotest 실험계와 초파리 돌연변이 검출계에서 이들 분획물들에 의한 항돌연변이 효과 실험을 행하여 된장의 항돌연변이효과를 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 검토하고자 한다.

재료 및 방법

재료

콩된장(100% 콩된장), 70% 콩된장(콩:밀=7:3) 및 콩(US number 1 soybean)은 화영식품(주)으로부터, 청국장(콩:태광)은 한국청국장협회로부터 구입하였고, 미소(light yellow miso, 콩:쌀:소금=100:60:45)는 일반 시장에서 Maruseng사의 제품을 구입하여 실험에 사용하였다. 콩된장과 70% 콩된장은 각각 3개월 동안 숙성시킨 된장이었다.

시료의 조제

콩된장, 된장, 청국장 및 미소는 동결 건조한 다음 분말화하였고 원재료인 콩과 콩/밀가루는 건조상태에서 각각 5배의 메탄올을 넣고 3회 추출하였다. 회전식 진공 농축기(Buchi oil & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

된장의 용매 추출 및 분획

된장의 항돌연변이 활성 물질을 추출하기 위해 극성이 다른 용매로 더욱 분획하였다. 된장을 동결 건조한 후 분말(4080 g)로 만들었고, 헥산으로 3회 추출하고 얻어진 잔사물(3975 g)을 2배 메탄올로 95°C에서 환류 냉각기를 사용하여 3회 추출(836 g)하였다(methanol soluble fraction). 회전식

진공 농축기를 이용하여 농축한 후, 다시 디클로로메탄(dichloromethane), 에틸아세테이트(ethylacetate) 및 부탄올(butanol)로 분획하여 용매를 제거하고 각각 디클로로메탄 분획물(104 g), 에틸아세테이트 분획물(27 g) 및 부탄올 분획물(91 g) 및 물 분획물(614 g)을 얻었다. 각각의 분획물들은 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

SOS chromotest

실험균주 및 균주의 형질확인 : 실험에 사용된 균주는 *E. coli* GC4436으로부터 유래된 *E. coli* PQ37로써 균주는 90% glycerol과 L medium에서 하룻밤 배양한 균액을 1:1로 혼합하여 -20°C에 보관하였다. 사용균주는 6개월마다 새로 준비하였으며 그때마다 *uvrA* mutation, *rfa* mutation과 PHO^c gene의 constitutivity 및 *sfia*::*lacZ* fusion의 inducibility를 검사하였다.

항돌연변이 실험 : Frame shift mutation과 point mutation을 동시에 측정할 수 있는 이 실험에서 Quillardet와 Hofnung(18)의 방법을 변형시킨 Baik과 Ham의 방법(19)을 이용하였다. 냉동 보관된 PQ37균액 50 μL를 5 mL L 배양액에 접종하고 37°C에서 하룻밤 진탕 배양한 후 이를 다시 5 mL L 배양액에 접종하고 37°C에서 A₆₀₀ 측정치가 0.3~0.4에 이를 때까지 2시간 정도 진탕 배양하였다. 얻어진 균액을 L 배양액에 1/10로 희석하여 각 농도별로 준비된 시료와 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma사)을 혼합한 시료 20 μL를 미리 분주하여 둔 96 well plate의 각 well에 100 μL씩 분주하고 90분간 37°C에서 진탕하여 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는 β-galactosidase(β-G)의 활성 측정을 위하여 O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside

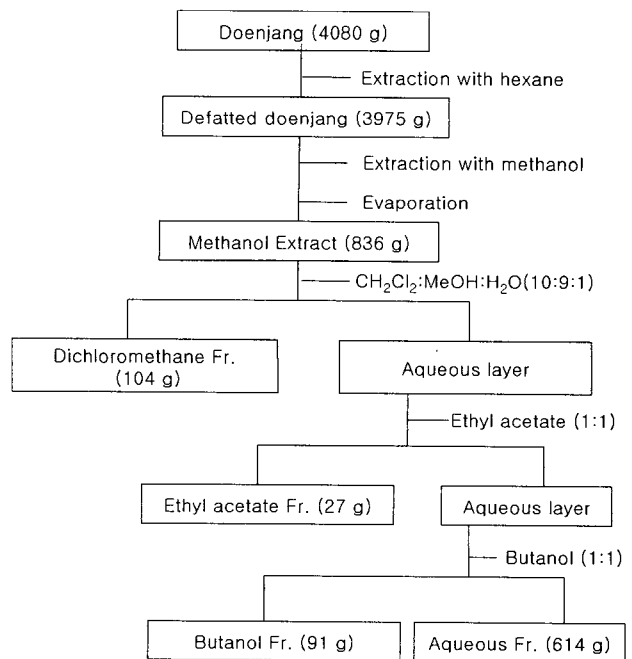


Fig. 1. The procedure for the solvent fraction of doenjang.

(ONPG) 100 μ L, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase (A-P)의 활성 측정을 위해 P-nitrophenyl phosphate disodium (PNPP) 100 μ L를 첨가하였다. 발색 시간은 50분으로 하였으며 β -G는 1.5 M Na_2CO_3 100 μ L로 A~P는 1 M HCl 50 μ L로서 효소에 의한 발색 반응을 정지시키고 5분후 A~P쪽에 50 μ L의 2 M tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 분광광도계로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 OD 420 nm 측정치는 다음과 같이 enzyme unit(Eu) 값을 구하였다(19).

$$\text{Eu} = (1000 \times A_{420}) / 50(\text{min})$$

In vivo 초파리 돌연변이 검출계를 이용한 항돌연변이 실험

Drosophila stocks와 배양조건 : 사용된 strain은 표지 유전자로서 *mwh*(mutiple wing hairs : 3~0.0) 유전자를 homo로 가지는 *y : mwh ju* strain과 *w*(white : 1~0.0) strain이다. 이 strain들은 일본 오오사카대학의 기초방사선 의학부의 Kondo 박사로부터 제공받았다. *mwh-w* 교배를 위해 미교배 *mwh* 암컷과 *w* 수컷을 3~4일간 분리하여 둔 후 40:40의 40 mL agar 배지(agar 1.5%, sugar 3%, propionic acid 0.5%)상에서 12시간 동안 교배시킨 후 40 mL의 표준배지가 들어있는 새로운 사육병(3×10 cm)으로 옮겨 8시간 동안 산란시켰다. 산란 72±4시간(3령기 유충) 후 얻어진 이형집합체(*mwh*+) 유충을 20% sucrose 용액으로 수세한 후 실험에 사용하였다.

항돌연변이 실험 : 돌연변이원으로는 aflatoxin(AFB_1)을 미국의 Sigma사에서 구입하여 이용하였다. 실험을 위해 상기 3령기 유충들이 들어있는 사육병(3×10 cm)의 배지 상에 AFB_1 0.5 mg과 여러 농도의 시료를 첨가하여 25°C 암실에서 성체가 될 때까지 사용하였다(14-16).

체세포 염색체 돌연변이 조사를 위한 날개준비 계수 : 이형 집합체를 가진 한쪽 날개를 절취하여 Faure's solution(gum arabic, 30 g; glycerol, 20 mL; chloral hydrate, 50 g; water, 285 mL)으로 영구 프레파라트를 만들어 배율 400배의 현미경하에서 mutant hairs을 가진 세포의 clone을 검색하였다. 프레파라트 제작은 초파리를 70% 에탄올에 고정시켜 두었다가 증류수가 담긴 용기에서 쌍안실체현미경을 통해 날개를 몸체로부터 떼어 내어 Faure's solution에 담구었다. 다음 slide glass 위에 이 날개를 일렬로 배열한 후, 45°C heat plate에 얹어 1시간동안 말린 후 1일간 건조시킨 다음 Faure's solution을 slide glass 위에 1~2방울 떨어뜨려 cover glass를 덮고 약 40 g의 추를 cover glass 위에 얹어 하루동안 두었다. 그런 다음 small *mwh* spots와 large *mwh* spots를 계수하였다.

통계분석

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

결과 및 고찰

In vitro SOS chromotest에 의한 항돌연변이 효과

SOS chromotest에 사용되는 *E. coli* PQ37은 *uvrA* 돌연변이와 *rfa* 돌연변이로 되어 있어, 돌연변이원이 균주내로 용이하게 침투할 수 있어 SOS 반응이 증폭되어 *sifA*의 발현이 일어나면 β -galactosidase의 활성으로 발색이 일어나게 되는데 이때 발색 수준을 spectrophotometer로 측정하여 살펴보는 실험계이다(7-10). SOS chromotest 실험에 의한 된장, 청국장, 미소 및 콩의 메탄올 추출물의 MNNG에 대한 돌연변이 억제효과를 본 것은 Table 1과 같다. 100% 콩된장 메탄올 추출물의 경우 100 μ g/assay 첨가했을 때 97%의 돌연변이 억제효과를, 그리고 70% 콩된장 메탄올 추출물은 87%의 억제효과를 가졌고, 청국장, 미소 메탄올 추출물의 경우 각각 73%, 60%를 보였다. 반면, 원재료인 콩과 콩/밀가루 메탄올 추출물은 33%, 7%의 낮은 저해효과를 나타내었다. Cui 등(20)은 Ames test에서 된장의 항돌연변이원성은 그 자체로도 효과를 나타내었으며 5% 다시마 분말을 첨가함으로써 시너지 효과 나타냄을 보고하였다. 따라서 Ames test에서 밝혀진 돌연변이 물질과 SOS 유발물질 사이에는 매우 밀접한 정량적 관계(9,10)가 있으므로 본 실험 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

한편 된장의 메탄올 추출물과 분획물들의 MNNG에 대한 돌연변이 억제효과는 Table 2에 나타내었다. 된장을 hexan으로 지방을 제거시킨 후 (hexan 추출물), 메탄올로 추출한 된장의 메탄올 추출물을 다시 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물로 나눠 본 결과, 100 μ g/assay 첨가농도의 경우, hexan, 메탄올, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물은 각각 73%, 73%, 91%, 95%, 82%, 73%로 전반적

Table 1. SOS response of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.05 μ g/assay) treated with methanol extracts (100 μ g/assay) of doenjang, other soybean products and soybeans

Sample	A_{420}	Eu ⁴⁾	Inhibition rate (%)
Spontaneous	0.44±0.09 ⁵⁾	8.8	-
Control	0.59±0.33 ⁶⁾	11.8	-
Doenjang (SF)	0.46±0.04 ^{b)}	9.2	87
SF (Soybean/flour) ¹⁾	0.58±0.02 ^{a)}	11.6	7
Doenjang (S) ²⁾	0.45±0.07 ^{b)}	8.9	97
S (Soybean)	0.54±0.03 ^{a)}	10.8	33
Miso ³⁾	0.50±0.001 ^{a)}	10.0	60
Chungkukjang	0.48±0.03 ^{ab)}	9.6	73

¹⁾Soybean:flour = 7:3.

²⁾Soybean (100%).

³⁾Light yellow miso.

⁴⁾Enzyme unit = (1000× A_{420})/50 min.

⁵⁾Mean±SD.

⁶⁾Means with the different letters beside symbol are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

Table 2. SOS response of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.05 µg/assay) treated with the fractionated samples (100 µg/assay) of methanol extracts from defatted doenjang

Sample	A ₄₂₀	Eu ¹⁾	Inhibition rate (%)
Spontaneous Control	0.35 ± 0.01 ²⁾	7.0	-
Doenjang	0.57 ± 0.02 ³⁾	11.4	-
Hex ext.	0.41 ± 0.02 ^b	8.2	73
MeOH ext.	0.41 ± 0.05 ^b	8.2	73
CH ₂ Cl ₂ fr.	0.37 ± 0.02 ^c	7.4	91
EtOAc fr.	0.36 ± 0.01 ^c	7.2	95
BuOH fr.	0.39 ± 0.04 ^b	7.8	82
H ₂ O fr.	0.41 ± 0.01 ^b	8.2	73

¹⁾Enzyme unit = (1000 × A₄₂₀)/50 min.

²⁾Mean ± SD.

³⁾Means with the different letters beside symbol are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

으로 매우 높은 저해효과를 가짐을 알 수 있었고, 특히 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물의 항돌연변이 효과가 가장 높았음을 관찰할 수가 있었다. 이상의 결과로부터 Ames test(6)와 SOS chromotest에서의 미생물 실험계에서 된장 메탄올 추출물은 다른 콩 관련 발효식품과 콩의 메탄올 추출물에 비해 돌연변이 유발 억제 작용이 가장 큰 것으로 나타났고 분획물들 중 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물들에서 큰 항돌연변이활성을 나타내었다. 선행된 연구로 Lim

등(21)과 Choi 등(22)은 된장 분획물이 *in vitro* 간암세포에 대하여 암세포 성장을 크게 억제함을 보고하였다. 따라서 된장은 항돌연변이활성뿐만 아니라 항암활성의 가능성도 있음을 시사하고 있다.

In vivo 초파리 돌연변이 검출계에서 항돌연변이 효과

된장 메탄올 추출물은 Ames test(6)와 SOS chromotest에서 여러 돌연변이원인 AFB₁와 MNNG에 대해 항돌연변이성을 나타내었는데 미생물계를 이용한 *in vitro*상의 실험에서 얻어진 현저한 저해효과가 진핵세포의 *in vivo*상의 실험에서도 효과가 있는지를 검토하기 위해서 초파리의 체세포 돌연변이 검출계를 이용하였다. 이미 많은 선행연구들에서 원핵생물인 *Salmonella*를 이용한 Ames 검출계와 진핵생물로 마우스를 이용한 발암실험의 중간 screening계로서 두 실험계의 단점을 보완해 줄 것으로 평가되어지고 있는 초파리는 유전학적으로 많은 연구가 축적되어져 있고 포유류 대사효소계의 대부분을 가지고 있는 준포유(submammarian) 진핵 생물에 해당되어진다(23-26).

초파리의 wing hairs spots 시스템에서 대조군과 된장 메탄올 추출물로 처리된 군의 mutant clone의 빈도를 Table 3에 나타내었는데 small *mwh* spots, large *mwh* spots가 적게 나타났으므로 된장 메탄올 추출물 자체는 본 실험 조건하에서 체세포 염색체 상의 결실, 불분리 현상, 체세포 염색체 재조합 등을 포함한 어떠한 돌연변이도 유도하지 않았다는 것을 의미한다. Table 4는 초파리의 wing spots test 시스템

Table 3. Somatic mutation and recombination detected as two types of mutant spots in the *Drosophila* wing hairs spot system (*mwh*/+) after 3rd instar larval (72 ± 4 hr) treatment with methanol extracts from doenjang

Exposure dose (%)	Frequency per wing (number) of		No. of wing scored
	Single spots		
	Small <i>mwh</i>	Large <i>mwh</i>	
Control	0.05 (6)	0 (0)	120
Doenjang	0 (0)	0 (0)	56

Table 4. Effect of the methanol extracts from doenjang on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.5 mg/bottle) in the *Drosophila melanogaster* wing spot system (*mwh*/+)

Exposure dose (%)	Frequency per wing (number) of		No. of wing scored
	Single spots		
	Small <i>mwh</i>	Large <i>mwh</i>	
Control	0.05 (6) [0] ¹⁾	0 (0) [0]	120
AFB ₁ only	0.69 (39) [100]	0.433 (26) [100]	60
AFB ₁ + Doenjang 2.5	0.517 (15) [73]	0.276 (8) [64]	29
AFB ₁ + Doenjang 5	0.467 (7) [65]	0.467 (7) [108]	15
AFB ₁ + Doenjang 10	0.818 (27) [120]	0.545 (18) [126]	33

¹⁾Relative frequency (%); Calculated from the number-per-wing values by subtracting the control value. For example, 100% for small *mwh* spot corresponds to 0.69-0.05=0.64 (number per wing in 0.5 mg treatment group), and 73% corresponds to 0.517-0.05=0.467 (number per wing) (24).

에서 AFB₁의 체세포 돌연변이 유발에 대한 된장 메탄올 추출물의 효과를 나타낸 것이다. Negishi 등(27)의 방법을 적용해 본 결과 Small *mwh* spots의 경우, AFB₁ 단독 처리군을 체세포 돌연변이 유발 100%로 기준해서 배지 당 된장 메탄올 추출물 2.5%, 5% 첨가농도의 경우 각각 27%, 35%의 낮은 항돌연변이 효과를 가짐을 알 수 있었고, large *mwh* spots의 경우는 된장 메탄올 추출물 5%, 10% 첨가농도에는 효과가 없었고 오히려 체세포 돌연변이 유발성이 나타났으나, 2.5% 첨가농도에는 36%의 항돌연변이 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 앞서의 *in vitro* Ames test(6)와 SOS chromotest에서와는 달리 다소 떨어지는 돌연변이 억제 효과가 나타났고 낮은 농도에서는 약간의 항돌연변이 효과를 가졌으므로 이상의 결과로 미루어 볼 때 *in vivo* 항돌연변이 실험에서는 배지 당 첨가농도 5%보다 높은 농도에서는 오히려 돌연변이성이 증가하는 것으로 나타났다.

한편, 된장의 메탄올 추출물은 각 구성별 용매로 다시 추출했을 때 SOS chromotest에서 가장 활성이 큰 에틸아세테이트 분획물이 진핵세포의 *in vivo* 상의 실험에서도 효과가 있는지를 검토하기 위해 초파리의 체세포 돌연변이 검출계를 이용하였다. 초파리 wing hairs spots 시스템에서 대조군과 된장의 에틸아세테이트 분획물로 처리된 군의 mutant clone의 빈도를 Table 5에 나타내었는데, small *mwh* spots, large *mwh* spots를 계수하여 대조군에 비해 된장의 에틸아세테이트 분획물을 첨가했을 때 spots가 적게 나타났으므로 본 실험 조건하에서 어떠한 돌연변이도 유도하지 않았다는

것을 의미한다. Table 6은 초파리에 대한 된장 에틸아세테이트 분획물의 효과를 나타낸 것이다. AFB₁ 처리후, 체세포 염색체상의 결실, 불분리현상으로 인한 small *mwh* spots의 출현빈도에 대해 된장 에틸아세테이트 분획물의 저해 경향을 살펴보면, AFB₁ 단독 처리군은 체세포 돌연변이 유발 100%로 기준해서 된장의 에틸아세테이트 분획물 5%, 10% 첨가농도의 경우 각각 3%의 체세포 돌연변이성을 가지는 것으로 나타나서 각각 97%의 높은 항돌연변이 효과를 가짐으로 낮은 농도에서부터 강하게 체세포 돌연변이를 억제함을 알 수 있었고, large *mwh* spots의 경우는 된장의 에틸아세테이트 분획물 5%, 10% 첨가시 각각 100%, 96%의 저해효과를 나타냄으로써 오히려 5%의 낮은 농도에서 체세포 염색체 재조합이나 *mwh*+ 좌위에 유전자 돌연변이를 현저하게 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 된장 메탄올 추출물은 다른 콩 관련 발효식품과 콩의 메탄올 추출물에 비해 *in vitro* SOS chromotest에서 높은 돌연변이 유발 억제 작용을 나타냈고 분획물들 중 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 비교적 높은 억제 효과를 확인할 수가 있었다. SOS chromotest의 결과와 비교해 볼 때 *in vivo* 초파리 돌연변이 검출계의 경우, 된장 메탄올 추출물을 첨가했을 때는 항돌연변이 효과가 검출되지 않았으나 메탄올 추출물을 극성 용매별로 더욱 분획하여 얻어진 에틸아세테이트 분획물의 경우에는 강한 돌연변이 억제효과가 관찰되었다. 본 연구에서는 *in vitro* 상에서 SOS chromotest 실험뿐만 아니라 Ames 실험계와

Table 5. Somatic mutation and recombination detected as two types of mutant spots in the *Drosophila* wing hairs spot system (*mwh*/+) after 3rd instar larval (72±4 hr) treatment with ethylacetate (EtOH) fraction of methanol extracts from defatted doenjang

Exposure dose (%)	Frequency per wing (number) of		No. of wing scored
	Single spots		
	Small <i>mwh</i>	Large <i>mwh</i>	
Control	0.05 (6)	0 (0)	120
Doenjang EtOAc fr.	0.027 (1)	0 (0)	37

Table 6. Effect of ethylacetate (EtOH) fraction of methanol extracts from defatted doenjang on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.5 mg/bottle) in the *Drosophila melanogaster* wing spot system (*mwh*/+)

Exposure dose (%)	Frequency per wing (number) of		No. of wing scored
	Single spots		
	Small <i>mwh</i>	Large <i>mwh</i>	
Control	0.05 (6) [0] ¹⁾	0 (0) [0]	120
AFB ₁ only	0.65 (39) [100]	0.433 (26) [100]	60
AFB ₁ + Doenjang EtOAc fr. 5	0.067 (4)* [3]	0 (0)* [0]	60
AFB ₁ + Doenjang EtOAc fr. 10	0.070 (4)* [3]	0.018 (1)* [4]	57

¹⁾Relative frequency (%); Calculated from the number-per-wing values by subtracting the control value. For example, 100% for small *mwh* spot corresponds to 0.65-0.05=0.60 (number per wing in 0.5 mg treatment group), and 3% corresponds to 0.067-0.05=0.017 (number per wing) (24).

*Significantly different from AFB₁ only control at the p<0.05 level.

마우스 발암실험의 중간 실험계인 *in vivo* 초파리 실험에서도 된장의 항돌연변이 효과를 밝혔으며 이상의 결과들로부터 된장이 나타내는 항돌연변이 활성 물질은 에틸아세테이트 분획물에 함유되어져 있는 것으로 추정되어지며 이 분획물을 더욱 정제하여 최종 활성 물질의 확인이 필요하다고 사료되어지며 이에 대한 연구가 진행 중이다.

요 약

In vitro SOS chromotest 실험계에서 콩된장 메탄올 추출물의 경우 100 µg/assay 첨가시 97%의 돌연변이 억제효과를 70% 콩된장 메탄올 추출물은 87%의 억제효과를 가졌고, 청국장, 미소, 원재료인 콩과 콩/밀가루 메탄올 추출물보다 높은 저해 효과를 보였다. 된장의 메탄올 추출물을 더욱 분획하여 얻어진 분획물들, 즉 핵산, 메탄올, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 100 µg/assay 첨가했을 때 MNG에 대한 돌연변이 억제효과는 각각 73%, 73%, 91%, 95%, 82%, 73%로 전반적으로 매우 높은 저해효과를 나타내었으며, 특히 디클로로메탄과 에틸아세테이트 분획물의 항돌연변이 효과가 가장 높았음을 관찰할 수가 있었다. 초파리의 wing hairs spots 시스템의 small *mwh* spots의 경우, AFB₁ 단독 처리군을 체세포 돌연변이 유발 100%로 기준해서 된장 메탄올 추출물 2.5%, 5% 첨가농도의 경우, 각각 22%, 30%의 낮은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 분획물들 중 가장 활성이 높았던 된장의 에틸아세테이트 분획물 5%, 10% 첨가농도의 경우, 각각 97%의 높은 항돌연변이 효과를 가짐으로 낮은 농도에서부터 강하게 체세포 돌연변이를 억제함을 알 수 있었고, large *mwh* spots의 경우는 된장의 에틸아세테이트 분획물 5%의 낮은 농도에서 체세포 염색체 재조합이나 *mwh*⁺ 좌위에 유전자 돌연변이를 현저하게 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 된장 메탄올 추출물은 다른 콩 관련 발효식품과 콩의 메탄올 추출물에 비해 *in vitro* SOS chromotest에서 높은 돌연변이 유발 억제 작용을 나타냈고 분획물들 중 에틸아세테이트 분획물은 *in vitro*와 *in vivo* 돌연변이 유발실험에서 가장 높은 저해효과를 나타내어 된장의 항돌연변이 활성을 가지고 있는 분획물로 추정되어진다.

문 헌

1. Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol* 27: 230-234.
2. Choi GS, Lim SY, Choi JS. 1998. Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, meju and doenjang. *Korean J Life Sci* 8: 473-478.
3. Lee JS, Cheigh HS. 1997. Antioxidative characteristics of isolated crude phenolics from soybean fermented foods (doenjang). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 376-382.

4. Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. 1990. Antimutagenic effect of doenjang (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin B₁. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 156-162.
5. Park KY, Moon SH, Rhee SH. 1995. Antimutagenic effect of doenjang (Korean soy paste)-Inhibitory effect of doenjang stew and soup on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁. *Environ Mutagen Carcinogen* 14: 145-152.
6. Park KY, Lim SY, Rhee SH. 1997. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of doenjang. *J Korean Assoc Cancer Prevention* 1: 99-107.
7. Quillardet P, Huisman OD, Ari R, Hofnung M. 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5971-5975.
8. Quillardet P, Bellecomide CD, Hofnung M. 1985. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat Res* 147: 79-95.
9. Rueff JA, Borba LH, Chaveca T, Gomes MI, Halpern M. 1986. Genetic toxicology of flavonoids: The role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation, SOS function and sister-chromatid exchanges. *Mutagenesis* 1: 179-183.
10. Ohta T, Nakamura N, Moriya M, Shirai T, Kada T. 1984. The SOS function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 131: 101-109.
11. Wurgler FE, Graf U, Frei HJ, Juon H. 1983. Genotoxic activity of the anticancer drug methotrexate in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 122: 321-328.
12. Graf U, Juon H, Katz AJ, Frei HJ, Wurgler FE. 1983. A pilot study on a new *Drosophila* test. *Mutat Res* 120: 233-239.
13. Graf U, Wurgler FE, Katz AJ, Frei HJ, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6: 153-188.
14. Yoo MA, Ryo H, Todo T, Kondo S. 1985. Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. *Japan J Cancer Res* 76: 468-473.
15. Choi YH, Yoo MA, Lee WH. 1992. Somatic mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine detected by *Drosophila* somatic gene and chromosome mutation assaying system. *Korean J Genetics* 14: 189-202.
16. Graf U, Heo OS, Ramirez OO. 1992. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat Res* 266: 197-203.
17. Graf U, Frei HJ, Kagi A, Katz AJ, Wurgler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222: 359-373.
18. Quillardet P, Hofnung M. 1985. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins. *Mutat Res* 147: 65-78.
19. Baik CW, Ham SS. 1990. Antimutagenic effects of brown-ing products reacted with polyphenol oxidase extracted from apple by using SOS chromotest. *Korean J Food Sci Technol* 22: 618-624.
20. Cui CB, Lee EY, Lee DS, Ham SS. 2002. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from Korean traditional doenjang added sea tangle. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 322-328.
21. Lim SY, Park KY, Rhee SH. 1999. Anticancer effects of doenjang in *in vitro* sulforhodamine B (SRB) assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 240-245.
22. Choi SY, Cheigh MJ, Lee JJ, Kim HJ, Hong SS, Chung KS, Lee BK. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste (doenjang) on the various tumor

- cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 458-463.
23. Hallstram I, Magnusson J, Ramel C. 1982. Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosoamine and genetically determined variation in the level and induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutat Res* 92: 161-168.
24. Wild D, Gocke E, Harnasch D, Kaiser G, King MT. 1985. Differential mutagenic activity of IQ (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline) in *Salmonella typhimurium* strain *in vitro* and *in vivo*, in *Drosophila* and mice. *Mutat Res* 156: 93-102.
25. Vogel E, Elijeven WGH, Kortselius MJH, Eijstra JA. 1982. A search of the some common characteristics of the effects of chemical mutagen in *Drosophila*. *Mutat Res* 92: 69-87.
26. Ryo H, Yoo MA, Fujikawa K, Kondo S. 1985. Comparison of somatic reversions between the *ivory* allele and transposon-caused mutant alleles at the white locus of *Drosophila melanogaster* after treatment with X-rays and ethyl methanesulfonate. *Genetics* 110: 441-451.
27. Negishi T, Arimoto S, Nishizaki C, Hayatsu H. 1989. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxic of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]-indole(Trp-P-2). *Carcinogenesis* 10: 145-149.

(2004년 6월 11일 접수; 2004년 10월 7일 채택)