

된장의 안전성과 암예방 효과

부산대학교 식품영양학과 및 암연구소

박 건 영

Destruction of Aflatoxins during the Manufacture of Doenjang by Traditional Method and Cancer Preventive Effects of Doenjang

Kun-Young Park

*Department of Food Science and Nutrition, and Pusan Cancer Research Center,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea*

Doenjang(Korean fermented soypaste) was suspected to be contaminated by aflatoxins from *Aspergillus flavus* due to the traditional natural fermentation. However, the aflatoxins could be destroyed even though *A. parasiticus* was contaminated on purpose during the manufacture of the doenjang. Ammonia and browning products from the fermentation, increase of pH, sunlight, especially the addition of charcoal degraded the formed aflatoxins during the process. On the contrary, doenjang exhibited the strong antimutagenic and anticancer activities. The methanol extract of doenjang showed antimutagenic activities against various carcinogens. The antimutagenic activity still remained even in the boiling products of doenjang soup and doenjang stew. The major active compounds found in doenjang were linoleic acid and genistein. Linoleic acid showed antimutagenic and anticancer effect *in vitro* and *in vivo*. The hexane extracts of doenjang inhibited the cyclin B₁ formation and synthesis of mRNA of the cyclin B₁, indicating the extract arrested the cell cycle progression at G₂-M. The doenjang extracts inhibited tumor growth of sarcoma-180 in Balb/c mice, and prolonged the life span of the mice. The extracts increased the glutathione S-transferase activity in the mice liver. Thus doenjang is safe from the aflatoxin contamination if we prepare it by the traditional method, and also it can be a good cancer preventive food.

Key Words: Doenjang, Aflatoxins, Antimutagenic, Anticancer

대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997
대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997
대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997
대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997
대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997
대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997
대한암예방학회지 : 제 2 권 제 1 호 1997

박 건 영
박 건 영
박 건 영
박 건 영
박 건 영
박 건 영
박 건 영

-된장의 안전성과 암예방 효과-
-된장의 안전성과 암예방 효과-
-된장의 안전성과 암예방 효과-
-된장의 안전성과 암예방 효과-
-된장의 안전성과 암예방 효과-
-된장의 안전성과 암예방 효과-
-된장의 안전성과 암예방 효과-

서 론

된장은 한국의 대표적인 발효식품이며 주식인 쌀밥과 함께 주요 단백질원으로 국민건강에 지대한 영향을 끼쳐왔다. 재래식된장은 별짚 및 자연히 메주에 붙은 미생물에 의한 발효로부터 제조되는데 콩의 고분자영양소를 발효분해하여 맛과 소화력 및 저장성을 증진시킨 한국의 중요 전통 발효식품의 하나이다. 최근에는 쌀, 보리, 밀 등을 콩과 함께 혼합하여 코지를 이용한 개량식 된장이 상품화되어 있지만 우리 재래식 된장의 과학적 연구 및 개선으로 인한 전통 된장의 상품화도 필요하다.

재래식 된장은 우리나라의 좋은 기후로 인한 자연발효를 하기 때문에 저장성 곰팡이중 *Asp. oryzae*과 같은 종이며 비슷한 형태를 가진 *Asp. flavus*의 발효중 관여로 인해 aflatoxin 오염에 의한 발암성, 특히 우리나라에서 흔한 위암발생의 원인으로 의심의 대상이 되기도 하였다¹⁾. 그러나 재래식 된장은 콩을 원료로 한 저장성 발효식품이기에 콩으로부터 유래된 활성물질들, 예를 든다면 불포화지방산^{2,5)}, isoflavones⁶⁾, trypsin inhibitor⁷⁻¹⁰⁾, 식이섬유소¹¹⁾, 비타민 E¹²⁾ 등 여러 암을 예방할 수 있는 활성물질이 존재하므로 암예방의 효과를 가질 가능성도 충분히 있다.

본 연구에서는 먼저 된장에 과연 aflatoxin 생성균이 발효중 오염되어 aflatoxin을 생성하며 그 aflatoxin이 발효속성 중 잔존할 것인지 등을 검토하여 된장의 안정성을 확인하고, 된장의 암예방 효과를 위한 항돌연변이효과와 활성물질의 동정과 함께 그 항암성을 검토하여 된장의 우수성을 밝히고자 하였다.

재래식 된장의 aflatoxin에 대한 안전성

곰팡이독(mycotoxin)이란 말이 크게 대두된 것은 녹색누룩곰팡이류에 속하는 *Asp. flavus*균이 제 2차 대사산물로 aflatoxin(이하 AF라고 함)을 생산하는 것이 알려진 1960년대 초 부터이다. AF는 곰팡이독의 일종으로 지금까지 알려진 발암물질중 가장 발암성이 강한 독물질임이 여러 실험을 통해 밝혀졌는데 그 종류는 13종 이상이나 되며 그 중 가장 강한 발암성을 나타내는 것이 AF B₁이다¹³⁾.

AF이 발견된 후 곰팡이가 메주에 자연히 붙어 발효하는 우리 재래식 된장이 이 발암물질에 오염되어 있지 않겠는가하는 의심을 받게되었다. 특히 된장 발효에 주로 관여하는 *Asp. oryzae*가 AF 생산균주와 비슷한 색깔 및 형태를 가지고 있어 이에 대한 확인 연구가 필요하였다.

한편 이때 전주예수병원의 Crane등¹⁾은 1962~1968년 한국의 위암환자들을 대상으로 역학조사를 실시해 본 결과 위암환자들이 정상인보다 현저하게 된장을 많이 섭취하였다고 하였으며(p<0.001) 그 된장시료에서 *Asp. flavus*라는 AF를 생성하는 곰팡이를 분리해 낼 수 있었다고 주장하였다. 이때만 하더라도 AF를 발견한지 얼마되지 않았고 또 이 곰팡이가 다른 누룩 곰팡류와 비슷해 실험

결과에 대한 정확성에 문제가 있었다. 그러나 이 발표가 Time지¹⁴⁾에 발표되어 한국의 재래식 된장은 암의 원인식품으로 의심 받게되고 재래식 된장 제조의 불편함과 비과학성 그리고 AF과 같은 발암물질이 존재하는 것으로 잘못 인식되게 되었다.

Park과 Bullerman¹⁵⁾은 실험실내에서 메주를 만들어 AF 생성균으로 AF 생성정도를 검토해 본 결과 메주에서 이들 곰팡이의 성장은 잘 되었지만 AF 생성은 단 식품에 비해 매우 저조하였다. 재래식 된장발효시 메주에서는 20여 종류의 곰팡이가 발견되었는데 *Asp. oryzae*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* species가 주요 곰팡이류였으며 8개의 분리된 세균 중에서는 *Bac. subtilis*가 대표적인 균으로 나타났다¹⁶⁾. 자연조건을 모방하기 위해 Park등¹⁷⁾은 메주에 직접 *Asp. parasiticus*(AP, *A. flavus*의 동종으로 AF 생산을 가장 많이함)로 발효시킨 단독균주처리균과 된장발효시 주발효균으로 알려진 *B. subtilis*(BS)와 *A. oryzae*(AO), 그리고 *A. parasiticus*를 첨가한 혼합균을 사용하여 혼합균주 처리균으로 메주의 발효숙성동안의 AF 생성정도를 추적해 보았다.

Fig. 1에서 보듯이 AF는 4주 발효동안에 AF B₁ 및 G₁이 계속 생산되었지만 G₁이 B₁보다 많았다. 혼합균주(AP+AO+BS)의 경우는 단독균주처리균보다 B₁의 생산도 약 1/3 정도였으며 또한 G₁은 3주에 0.5 mg/g생성되다가 4주에는 약 80%가 파괴되었다. 콩의 종류 및 크기에 따라 AF 생성량이 다르게 나타났는데 큰 크기의 장엽콩으로 메주를 만들었을때 큰 크기의 장엽콩에서는 작은 크기의 단엽콩에 비해 약 50%의 AF이 생성되어 큰 크기의 콩이 AF생성을 적게하는 것으로 관찰되었다. 그후 AF는 숙성과정중 파괴되었는데 대체적으로 AFB₁ 생성량은 매우 낮았다. Table 1에서 보듯이 발효된 메주는 소금물에 한 달 숙성 후 2.1~69.3%의 AFB₁과 52.5~83.8%의 AFG₁이 AP 단일균주처리시 파괴되었고, 혼합균주발효메주에서는 6.4~23.5%의 AFB₁과 31.1~45.8%의 AFG₁이 파괴되었다. AF파괴율은 혼합균주에서 보다는 단일균주에서 더 높았다. 그러나 메주를 물에 띄우는 동안 단일균주 및 혼합균주 시료 모두에서 AFB₁은 95.1~98.5%, AFG₁은 99.7~100%가 파괴되어 AF는 대부분 파괴, 제거되었다. 그리고 메주를 소금물에서 담근동안 대부분의 AF(96~100%)은 발효된 메주에 존재했지만 물에 담근 동안에는 발효된 메주뿐만아니라 많은 양의 AF이 물과 숯에서 발견되었다. AF는 ammonia에 의해 파괴되는데 ammonia용액에서 AF는 거의가 다 파괴된다¹⁹⁻²¹⁾. Lee²²⁾는 된장의 숙성과정 중 메주의 암모니아 양은 크게 증가한다고 하였으며, 된장발효과정 중 콩내의 단백질(41%)이 작은분자의 peptide로 분해되어지고 이것이 더 분해되어 암모니아가 되어 물에 용해된다. 물에 메주를 띄운 실험계에서는 특히 pH가 소금물에 띄운 것보다 현저히 증가(p<0.05)되고 이때 암모니아 양은 훨씬 많았다¹⁷⁾.

Table 2에서 보듯이 NH₃농도 0.05~0.5%에서 AF는 매우 불안정하여 0.05%에서도 24시간 후 99.8%가 파괴되는 것을 보여 주고 있다. 박과 이²¹⁾는 NH₃의 효과는 pH

의 상승때문이라고 하였는데 AF은 낮은 pH와 높은 pH에서 불안정하다²³⁾. 그러나 간장의 pH 7(중성)에서는 60~70%의 AF이 파괴되는 것이 관찰되었다. 실제 재래식 간장에서 NH₃양이 0.2%일때 pH는 4.7이고, 0.5%일때는 pH 6.8이었기에⁽²¹⁾ 간장에서는 NH₃외에 다른물질이 AF의 파괴에 관여 하리라고 추정된다.

Fig. 2에서 보듯이 AF은 소금물에서 숙성 2달후 80~90%가 파괴되고 3달후에는 거의가 다 제거되었다. 숙성기간 중 AF파괴는 1차 반응을 따르는 것 같았고 AFG₁이 AFB₁ 보다 그 파괴속도가 매우 컸었다. 콩알이 큰 장엽콩이 작은 콩으로 만든 단엽콩 메주보다 AF파괴속도가 빠르게 나타났다. 그러므로 메주콩으로 크기가 큰것이 AF생성량이 적으며 파괴율도 높다고 하겠다. 90~100%의 AF이 소금물에 담그는 3달동안에 파괴되었으며 잔존된 미량의 AF은 주로 메주에 남아있었다. 그래서 숙성기간이 길수록 파괴는 더 많이 되어, 이는 Lee²²⁾가 발효된 메주를 섭취한 쥐는 PERI이 떨어지고 몇몇 쥐는 사망했지만 된장의 섭취시는 PERI이 증가하고 쥐가 죽지않았다는 결과를 잘 설명해 준다고 하겠다.

재래식된장 숙성과정 중 솥을 첨가하는데 이는 미생물의 더 많은 오염을 막고 좋지 않은 flavor를 제거하는 역할을 하는데 숙성기간 중 솥에 간장보다 더 많은 AF이 발견되었고 그리고 소금물 보다 물에 띄운 솥에 AF이 더 많이 잔존하였다. 솥은 AF을 흡수할 뿐만 아니라 시스템 내에 솥의 존재는 솥을 넣지 않은 것보다 현저히 AF을 파괴시켰고¹⁷⁾, 활성화하고 표면적이 넓은 활성탄은 100% AF파괴 및 제거에 영향을 끼치는 것으로 나타났다²⁴⁾. 한편 숙성과정 중 AFG₁의 파괴속도는 쉽게 일어나지만 크기가 큰 메주에서는 AFB₁의 파괴속도가 작은 크기의 메주보다 느리게 나타났기때문에 숙성과정 중 메주의 크기를 적게 하는 것이 좋으며¹⁷⁾ 이는 Oh²⁵⁾도 큰 메주가 작은 메주보다 AF파괴 속도가 감소된다는 결과와 비슷하기에 숙성과정 중 메주의 크기를 작게하는 것도 AF의 파괴에 한 역할을 한다고 하겠다. 또한 분리후 간장은 끓이는 과정을 갖게되는데 이 과정은 남은 미생물을 사멸시키며, 농축을 시키고 단백질을 coagulate하고 좋지 않은 냄새를 제거하는 효과가 있는데 이 경우도 AFB₁은 파괴되는 것으로 나타나, 간장내에서 15분 끓인 후에 AFB₁은 75%가 파괴되었다¹⁷⁾.

결국 된장과 간장에서 AF오염은 메주 발효와 숙성 과정에 따라 영향을 받을수 있지만 그 가능성은 매우 적다 하겠다. 먼저는 AF생성 곰팡이가 메주발효에 관여하지 않아야 되고, 관여되더라도 메주는 주로 온도가 낮은 겨울에 제조되기에 저온성 곰팡이가 많이 자랄수 있어 경쟁적으로 자라게되면 AF생성 균주는 경쟁에 약하며¹³⁾ 중온성 균이기에 오염을 적게 할 수 있다. 김등²⁶⁾은 우리나라의 북쪽지방에서 제조된 메주와 된장시료에서는 AF을 전혀 발견하지 못하였다고 보고한 바 있다. 한편 된장 및 간장의 발효숙성과정을 거치면서 생성되는 갈색물질도 AF의 파괴에 영향을 끼쳤다²⁴⁾. pH 7의 간장에 AFB₁을 첨가하고 30°C에서 5일간 반응한 후 60~70%의 AFB₁이 파괴

되는 현상이 관찰되었다. 박등²⁴⁾은 0.05% 갈색물질을 완충용액(pH 7)에서 AFB₁과 반응시켰을때 2일 반응후 이미 60~70%의 AFB₁의 파괴를 일으켰다고 보고하였다. 그리고 갈색색소는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100에서 복귀돌연변이 수를 각각 50%와 70% 감소시켜 AFB₁의 돌연변이성을 억제하는 효과를 나타내었다.

재래식 된장발효시 우려될 수 있는 AF의 오염은 이런 여러인자들에 의해 제조과정중 파괴의 가능성이 있으며 또한 이러한 파괴는 간장내 뿐아니라 메주자체에 오염되어있는 AF까지 파괴할 수 있다. 발효기간내의 햇빛에 말림, 저온, 경쟁적 혼합균주발효계, NH₃, pH조절, 솥, 갈색물질, 메주 크기 조절 등은 AF균이 오염되어 AF이 생성된다 하더라도 AF오염을 방지할 수 있다. 특히 3달 숙성후 대부분의 AF이 파괴되었으므로 더 장기간 발효숙성되는 된장, 간장내의 AF오염은 거의 일어나지 않으리라 예상된다. AF은 일반적으로 비교적 안정하다고 하지만 자외선, 산, 알칼리 및 산화제, bisulfate등에 의해 파괴될 수 있다고 알려져 있다²³⁾.

된장의 항돌연변이성 및 항암성

재래식 된장은 콩으로부터 제조되기에 콩 및 콩 발효식품이 가질수 있는 항암성 물질들인 trypsin inhibitor⁷⁻¹⁰⁾, 비타민 E¹²⁾와 isoflavones⁶⁾을 비롯한 항산화물질 그리고 불포화지방산등²⁻⁵⁾이 다량 존재하기에 오히려 이들로 인해 항발암적으로 작용할 가능성이 있다.

Shin등²⁷⁾은 메주가 AFB₁과 benzo(a)pyrene에 의한 돌연변이성을 억제하는 효과가 있다고 보고한 바 있으며 또한 AF처리 대조군의 경우에는 암이 발생하였는데도 AF오염된 메주를 쥐에게 먹었을때에는 암이 전혀 발생하지 않았다는 보고도 있다.

Kurechi등²⁸⁾은 일본 된장을 비롯한 콩으로 만든 식품은 nitrite를 파괴하고 N-nitrosamine생성을 방해하므로 이들로 인한 위암 발생을 감소시켜 준다고 하였다.

본 연구에서는 재래식 된장에 AF의 오염가능성은 앞에서 연구한대로 없지만 그래도 만약에 AF이 오염된다면 이 경우에 된장이 가질수 있는 항발암적 효과를 검토하기 위해 돌연변이 유발성을 측정하여 발암성을 검토하는(상관계:85~90%)²⁹⁾ Ames mutagenicity test³⁰⁾를 이용하여 AFB₁등 여러 발암 물질에 대한 된장의 항돌연변이성을 먼저 연구하였다.

Fig. 3에서 보듯이 *Sal. typhimurium* TA98균주를 이용한 실험계에서 콩자체도 어느정도 AFB₁에 대해 항돌연변이 효과가 있었는데 시료들의 50% 추출농도에서 생콩은 64%, 삶은 콩은 39%의 저해효과를 보인 반면 된장은 이때 100%의 저해효과를 나타내었고 통계적인 유의성이 관찰되었다(p<0.05)³¹⁾. 이 결과에서 나타난 사실중의 하나는 생콩이 삶은 콩보다 또 된장은 생콩, 삶은콩 보다 항돌연변이성이 강하다는 점이었다. 일본에서는 콩제품이 위암 발생을 방지한다고 주장하였는데 이와 관련된 물질이 trypsin inhibitor라 하였으며⁷⁾ 생콩내에 존재하는 trypsin

inhibitor의 항발암효과는 이미 알려진바 있다⁷⁻¹⁰. 이 단백질은 열에 불안정하여 삶는동안 파괴되어 삶은 콩에서는 그 저해도가 감소되었다고 하겠다. 그러나 된장은 이미 삶아서 메주를 만들어 발효숙성을 거친 제품이기때문에 된장에서 그 저해도가 증가된 이유는 생콩에서와는 달리 다른 어떤 발효산물이 항돌연변이적 효과와 관련이 있는 결과라고 생각된다. TA100균주에서도 생콩에서는 66%, 삶은 콩에서는 53%, 된장에서는 100%의 돌연변이 유발억제가 관찰되었다³¹.

Fig. 4에서는 재래식된장의 항돌연변이성이 대두로 제조된 다른 발효식품들과의 차이를 비교해본 결과이다. 일본된장, 청국장, 상품용 된장을 재래식 된장과 비교해 보았는데 재래식 된장의 활성이 가장 컸으며 다음으로 상품용 된장, 청국장, 일본된장의 순이었다. 위의 결과로부터 여러 종류의 미생물, 곰팡이류와 세균류가 발효에 관여하고 그 발효기간이 길고 콩만으로 만들어진 재래식된장이 항돌연변이성이 가장 높은 것으로 나타났으며 반면 쌀에서는 전혀 항돌연변이 활성이 관찰되지 않았다. 이러한 된장 메탄올추출물의 항돌연변이 효과는 다른 발암물질 특히 S9의 microsomal activation을 필요로하지 않는 MNNG와 4-NQO(4-nitroquinoline-1-oxide)에서도 강력한 항돌연변이 효력을 보였을 뿐 아니라 S9의 microsomal activation을 요구하는 nitrosodimethylamine과 benzo(a) pyrene의 돌연변이 유발성 역시 크게 저해하는 효력을 나타내었다³².

Kurechi등²⁸은 콩제품인 tofu, soya milk, miso, bonlact 등은 위내의 pH 3에서 nitrite와 dimethylamine에 의해 생성되는 nitrosamine의 생성을 크게 저해하였으며, precarcinogen인 nitrite도 직접 파괴하였는데 이때 관여한 물질은 불포화지방산과 폐놀계 화합물이라고 추정하였다.

된장은 주로 된장찌개 및 국으로 끓여서 먹기에 이들의 메탄올 추출물이 된장과 관련될 수 있는 발암물질인 AFB₁을 이용하여 항돌연변이 활성을 나타내는지 연구하였다³³. Table 3에서 보여주듯이 여러 부재료를 넣은 된장찌개의 경우 methanol추출물의 25%에서부터 활성이 크게 나타나 100% 시료농도에서는 AFB₁에 대해 91%의 항돌연변이 활성이 관찰되었다. 한편 된장의 methanol 추출물 50%는 93%의 저해효과를 나타내 다소의 활성이 감소되기는 하였으나 이는 부재료의 혼합때문이라고 사료된다. 그러나 된장찌개에 넣은 양파, 고추, 호박, 파 등도 다소의 항돌연변이 활성이 있는 것으로 보고되어³⁴ 된장찌개는 어떠한 식품보다도 발암물질(AFB₁)로 인한 암유발과 관련하여 암을 예방하는 식품으로 매우 중요한 역할을 한다고 생각된다. 한편 된장국의 경우도 5, 15분 끓인 후에도 된장찌개보다는 그 활성이 커서 된장국 methanol 추출물 25%첨가시 81~86%, 50, 100% 첨가에서는 89~91%의 항돌연변이 활성을 나타내었다. 이 활성은 된장을 5분, 15분 끓인 후 각각 별 차이가 없었으므로 된장내의 항발암 물질을 열에 안정한 물질로 추정되었다 (Table 4).

본 연구실에서는 이미 된장의 항돌연변이 물질을 잠정적으로 동정하였는데 그 주요화합물중 하나로 linoleic acid(LA)가 동정되었다³². 이 linoleic acid는 Ames실험계, SOS실험계, rec assay실험계에서 항돌연변이 활성이 확인되었으며^{35,36}, Hayatsu등²도 linoleic acid와 oleic acid는 *Salmonella typhimurium* 균주를 이용한 Ames실험계에서 항돌연변이 효과가 있다고 보고한 바 있다. Ha등^{37,38}은 햄버거에서 conjugated dienoic derivatives of linoleic acid(CLA)를 분리하여 항암효과를 연구한 바 있다.

LA는 여러암세포의 성장도 억제하는 것으로 나타났으며^{35,36} 면역계와 관련하여 LA는 natural killer 세포의 활성 증가 및 대식세포의 활성증가³⁹⁻⁴¹와 *in vivo*에서도 tumor 생성 억제 및 생명연장효과가 확인된 바 있다^{42,43}.

Zhu등⁴은 Ehrlich ascites carcinoma를 이식시킨 ACR mice에 LA처리시 항암효과가 컸으며 이때 LA는 암세포의 유리지방산 조성에 영향을 끼쳐 세포독성 효과를 일으키며 LA처리시 수명연장효과 및 종양의 크기도 현저하게 감소되었다고 보고하였다.

LA는 불안정해 약조건에서는 산화를 일으켜 free radical을 만드는 등 세포 건강에 나쁜쪽으로 반응할 수 있다. 그러나 된장은 어느 식품보다 항산화효과가 큰 것으로 확인되었고^{44,45} 특히 LA는 된장내에 있는 한 안전하게 보호되어 강한 항암효과를 나타내는 것으로 생각된다.

Fig. 5에서 보듯이 HT29 인체결장암세포에서 된장 추출물들은 암세포의 성장을 크게 억제하였다. 된장의 메탄올 추출물은 0.05% 첨가시 6일후 93%의 성장을 억제하였으며 메탄올의 분획중 핵산 분획이 가장 현저한 암세포 성장억제효과가 관찰되었다³⁶. 그다음에 에틸아세테이트, 클로로퍽스 분획 등이었다. 핵산 분획은 문³²의 연구에서도 가장 현저한 항돌연변이 활성이 나타났다. 핵산분획에서 활성물질로 동정된 LA는 HT29, SNU-C₁인체대장암세포, AZ-521 인체위암세포등에서 암세포 성장억제효과가 관찰되었다³⁶.

세포주기의 G₁ phase에서는 cyclin D와 E type의 발현이 일어나며 DNA합성의 시작단계인 S phase에서는 cyclin A가 주로 나타나고 S phase와 G₂ phase사이에서는 cyclin B가 발현된다⁴⁶. 이들 cyclins는 oncogene과 비슷하게 돌연변이를 일으키거나 암세포들의 경우처럼 과잉 발현 될 때 세포를 분화로 유도시키지 않고 계속 증식되도록 한다. Cyclin B는 S phase에서 합성되어져 M phase쪽으로 가면서 cdc 2와 결합하여 유사분열을 조절한다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 된장의 핵산추출물은 MCF-7 인체 유방암세포에서 cyclin B₁의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. Cyclin B₁생성의 억제는 transcription 수준에서 조절되는 것으로 나타나 Fig. 7에서 보는 바와 같이 cyclin B₁의 mRNA 생성이 현저히 감소 되는 것으로 확인되었다. 그리고 된장의 핵산추출물은 다른 cyclins이나 cdk_s 생성에는 크게 영향을 나타내지 않아 결국 G₂ phase에서 M phase로 가는 단계를 차단시키는 것으로 사료되며, 이러한 결과는 된장 추출물의 암세포 성장 및 DNA합성저해 결과³⁵와 잘연결되어 있다고

하겠나. 본 연구실에서는 최근에 genistein이 된장에서 또 다른 항돌연변이 및 항암활성이 있는 것으로 동정 확인되었는데 콩에서 된장으로 발효될 때 genistein이 더 많이 생성되었다. Genistein은 역시 G₂ phase에서 M phase로 가는 단계를 차단하며 apoptosis도 유도하는 것으로 확인되었다.

한편 *in vivo*에서 된장 시료에 의한 항암효과를 검토하기 위해 sarcoma-180 암세포를 접종한 후 32일 후에 마우스의 서혜부의 암조직을 적출하여 종양의 무게를 측정해본 결과는 Table 5와 같다⁴⁶⁾. 대조군은 3.28 g을 나타내었지만 된장의 핵산 추출물 5.0 mg/kg투여군은 1.18 g으로 64%의 저해효과를 나타내었으며 메탄올 추출물은 0.68 g으로 79.3%로 가장 높은 저해효과를 보였고 된장 가열액은 1.65g으로 49.7%의 저해효과를 나타내었다.

한편 생명연장효과는 대조군이 20.8일 인데 비해 핵산 추출물 처리군은 32.9일로 58.2%의 생명연장효과를 나타내었으며 메탄올 추출물은 34.6일로 66%의 수명연장효과를 나타내었다. 된장을 투여한 마우스의 간내 주요효소활성 변화를 보면 된장추출물은 간독성지표로 사용되는 aminotransferase의 활성을 감소시키는 효과가 있었으며 또한 해독기구에 관여하는 효소인 glutathione S-transferase의 활성을 정상적인 상태에서는 이 효소의 활성을 낮추고 S-180 암세포를 투여 하였을 때는 glutathione S-transferase의 활성을 증가시켜 독성물질을 대사하여 체외로 배출시키는 역할을 하는 등 암세포 성장으로 인한 간의 기능감소를 회복시키는 효과와 독소생성을 해독시키는 작용이 있는 것으로 관찰되었다⁴⁷⁾.

Coward⁶⁾은 콩에 존재하는 isoflavones는 유방암 예방에 중요한 역할을 하여 콩발효식품을 많이 섭취하는 동양인은 유방암예방효과가 크다고 하였고, 일본된장은 trypsin inhibitor의 존재로 제암효과가 크며⁷⁾ miso에 있는 젖산균을 비롯한 미생물들은 Trp- p-2발암물질을 제거하는 능력이 있다고 하였다⁴⁸⁾. 그러나 우리재래식 된장은 일본된장보다 훨씬 암예방 효과가 크다고 하겠으며 앞에서 소개된 물질외에도 다른 항(발)암물질의 존재 확인 또는 이들의 복합적인 작용 등에 대한 계속적인 연구와 이들의 기능성을 더욱 강조시킨 된장의 제조 등에 대한 연구도 필요하리라 하겠다.

요약 및 결론

재래식 된장은 자연발효에 의해 제조되기 때문에 곰팡이독의 오염 특히 강력한 발암물질인 aflatoxin(AF) 오염에 대한 우려가 있었다. 그러나 비록 AF를 생성하는 균이 발효중 오염된다 하더라도 콩의 특유한 기질로서의 특성 및 제조 방법에 의해 파괴되는것으로 나타났다. AF생성균은 중온성균으로 여러 혼합균주계에서는 경쟁력이 약하며, 콩단백질의 발효생산물인 암모니아, 아미노산 그리고 갈색색소, pH의 증가, 햇빛, 습의 첨가 등에 의해 파괴, 제거 됨이 확인되었다. 반면 재래식 된장은 콩발효식품으로 콩이 가지는 여러 항암물질 즉, 불포화지방산, 트립신

인hibit, 이소후라본, 비타민 E, 식이섬유소 등에 의해 항(발)암 활성이 있을 수 있다. 된장은 생콩이나 삶은 콩보다 훨씬 항돌연변이 활성이 컸으며 miso를 비롯한 다른 콩발효제품보다 항돌연변이 활성이 높았다. 된장의 암 예방효과는 된장을 끓인후에도 있었으며, 여러종류의 발암원에 대해 항돌연변이 활성이 확인되었다. 일련의 연구에서 활성물질중 주요물질의 하나로 linoleic acid가 동정되었는데 이물질은 *in vitro*와 *in vivo*실험계에서 항돌연변이, 항암, 면역활성증강효과등이 관찰되었다. 된장의 핵산 추출물은 MCF-7 인체유방암세포에서 세포주기의 단백질인 cyclin B₁생성과 이의 mRNA 합성을 억제하여 G₂에서 M phase로 가는 단계를 차단하여 항암효과를 나타내었다. 또한 된장추출물은 마우스에서 종양생성량을 크게 억제했을 뿐아니라 수명연장효과도 관찰되었으며 간의 glutathione-S-transferase 활성증가 등, 간 기능을 증진시키는 효과를 나타내었다.

결국 된장은 곰팡이독 중 가장 우려하였던 발암성이 강한 AF오염은 일어나지 않으며 설혹 AF생성균이 오염되어 발효과정중 관여한다하더라도 여러 인자에 의해 파괴된다고 하겠다. 그러나 과학적인 방법을 통해 이런 전통적 매주발효도 통제된 제조방법에 의해 이루어져야하며 미량의 AF의 오염 및 다른 곰팡이독의 오염이 일어나서는 안되겠다고 하겠다. 그리고 된장은 여러 실험을 통해 오히려 발암물질들에 대해 항돌연변이효과가 확인되어 암예방식품이라 할 수 있고, 또한 면역증강효과 및 항암효과가 뛰어난 식품이라 하겠으며 이제는 안전성을 확보하면서 과학화와 함께 활성을 더욱 강조한 기능성 된장의 개발이 필요하리라 하겠다.

참 고 문 헌

- 1) Crane PS, Rhee SU, Seel DJ. Experience with 1079 cases of cancer of the stomach seen in Korea from 1962 to 1968. *Am J Surg* 1970; 120: 747.
- 2) Hayatsu H, Arimoto S, Togawa K, Makita M. Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: Inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutat Res* 1981; 81: 287.
- 3) Begin ME, Das UN, Ells G. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Med* 1985; 19: 177.
- 4) Zhu YP, Su ZW, Li CH. Growth inhibition effects of oleic acid, linoleic acid and their methyl ester on transplanted tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1302.
- 5) Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC, Bell PRF. Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6 polyunsaturated fats. *Carcinogenesis* 1990; 11(12): 2191.
- 6) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, diadzein, and their beta-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem*. 1993; 41(11): 1961.
- 7) 青木宏. みそ汁三十不健康法, ことま書房, 日本. 1981
- 8) Yavelow J, Finlay TH, Kennedy AR, Troll W. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.(Suppl)* 1983; 43: 2454S.

- 9) Weed HG, McGandy RB, Kennedy AR. Protection against dimethylhydrazine-induced adenomatous tumors of the mouse colon by the dietary addition of an extract of soybeans containing the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 1985; 6(8): 1239.
- 10) Messadi DV, Billing P, Shklar G, Kennedy AR. Inhibition of oral carcinogenesis by a protease inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76(3): 447.
- 11) Lee SM, Rhee SH, Park KY. Antimutagenic effect of soluble dietary fiber from kale and soybean. *Environ Mut Carcinogens* 1993; 13(1): 26.
- 12) Mergens WJ, Bhagavan HN. α -Tocopherols(Vitamin E). In Nutrition and cancer prevention, Moon, TE and Micozzi, MS(ed), Marcel Dekker, Inc., New York 1989; p305.
- 13) 박건영. Aflatoxin과 그 생성에 관련되는 주요인. *한국영양식량학회지* 1984; 13(1): 117.
- 14) Time, May 9, 1969; p48.
- 15) Park KY, Bullerman LB. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J Food Prot* 1983; 46(3): 178.
- 16) Kim MC. The microbiological studies on Korean Jang. *J Gyeongsang Nat Univ* 1976; 15: 1.
- 17) Park KY, Lee KB, Bullerman LB. Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and its stability during the manufacture of Korean soy paste(Deonjang) and soy sauce (Kanjang) by traditional method. *J Food Prot* 1988; 51(12): 938.
- 18) 박건영, 이규복. 재래식된장, 간장 제조중 Aflatoxin의 파괴에 관한 연구. 부산대학교 가정대학 연구보고서 1987; 13: 49.
- 19) Gardner HK Jr, Kiltun SP, Dollear FG, Rayner ET. Inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals by ammoniation. *J Am Oil Chem Soc* 1971; 48: 70.
- 20) Lee LS, Stanley JB, Cucullu AF, Pons WA Jr, Goldblatt LA. Ammoniation of aflatoxin B₁: Isolation and identification of the major reaction product. *J Assn Off Anal Chem* 1974; 57: 626.
- 21) 박건영, 이은숙. 간장저장중 암모니아와 pH가 Aflatoxin B₁의 파괴에 미치는 영향. *한국영양식량학회지* 1989; 18(1): 115.
- 22) Lee CH. The effect of Korean soy sauce and soy paste making on soybean protein quality. Ph. D. Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 1975.
- 23) Marth EH, Doyle MP. Update on molds: Degradation of aflatoxin. *Food Technol* 1979; 33: 81.
- 24) 박건영, 이은숙, 문숙희, 최홍식. 간장 및 모델시스템에서 간장 갈색 물질과 숯이 Aflatoxin B₁의 파괴에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 1989; 21(3): 419.
- 25) Oh YJ. Studies on the destruction and toxicity of aflatoxin B₁ in Meju (Soybean cake) by the effect of sunlight irradiation. *J Chungbuk Nat Univ* 1976; 11: 153.
- 26) 김용화, 황보정숙, 이서래. 몇가지 한국식품중 Aflatoxin의 검출. *한국식품과학회지* 1977; 9: 73.
- 27) Shin SH, Jhee EC, Rapp NS, Hong IS, Chang SH, Seel DJ. Mutagenicity and antimutagenicity of Meju, hot sauce and other Korean foods by *Salmonella/mammalian-microsome* test: Abstract, The 5th Federation of Asian and Oceanian Biochemists, August, 13-18, Seoul, Korea. 1989; p301.
- 28) Kurechi T, Kikugawa K, Fukuda S, Hasunuma M. Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Fd Cosmet Toxicol* 1981; 19: 425.
- 29) McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella/microsome* test: Assay of 300 chemicals. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975; 72(12): 5135.
- 30) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173.
- 31) 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식. 된장의 Aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 효과. *한국영양식량학회지* 1990; 19(2): 156.
- 32) 문숙희. 된장의 항돌연변이 효과에 관한 연구. 부산대학교 대학원 석사학위논문. 1990
- 33) 박건영, 문숙희, 이숙희. 된장의 항돌연변이 효과 -된장찌개 및 된장국의 Aflatoxin B₁에 대한 돌연변이 유발억제효과-. *한국환경성돌연변이발암원학회지* 1994; 14(2): 145.
- 34) 박건영, 양한석, 이숙희, 류태형. 녹황색채소 및 민간 항암약재로부터의 항돌연변이 및 항암 물질의 분리, 동정과 이들의 생화학적 함양기작에 관한연구. 한국과학재단 최종보고서(KOSEF, 90-0500-03), 1993.
- 35) 임선영. Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문. 1994
- 36) 이정민. 된장추출물과 Linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문. 1993
- 37) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987; 8(12): 1881.
- 38) Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 1990; 50: 1097.
- 39) 정준현, 김광혁, 장명웅, 이승도, 서재관. Linoleic acid와 Ursolic acid가 마우스 복강 대식세포에 미치는 효과. *대한면역학회지* 1993; 15(1): 53.
- 40) 김광혁, 장명웅, 선우양일. Linoleic acid와 ursolic acid가 마우스 natural killer 세포활성에 미치는 효과. *고신대의학부 논문집* 1992; 8(1): 35.
- 41) 김광혁, 장명웅, 박건영, 류태형, 선우양일. Linoleic acid, ursolic acid, phytol, 들기름추출물이 마우스 phagocyte에 미치는 효과. *한국환경성돌연변이발암원학회지* 1993; 13(2): 135.
- 42) 하재청, 최은상, 류태형, 양한석, 박건영. Sarcoma 180에 대한 약용식물성분의 항암효과. *대한암학회지* 1991; 23(2): 197.
- 43) 류태형, 박성미, 정해영, 박건영, 하재청: 생쥐에 이식된 암세포에 있어서의 Linoleic acid의 암억제 효과. *대한암학회지* 1992; 24(4): 493.
- 44) 최홍식, 박경숙, 문갑순, 박건영. 지방질의 산화에 대한 된장 및 그 추출물의 항산화특성. *한국영양식량학회지* 1990; 19(2): 163.
- 45) 박경숙: 지방질의 산화에 대한 된장 및 그추출물의 항산화효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문. 1991
- 46) Beijersbergen, RL, Bernards R. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287: 103.
- 47) 손미현. 마우스에서 된장추출물의 항암효과 및 기작연구. 부산대학교 대학원, 석사학위논문. 1995
- 48) Asahara N, Zhang XB, Ohta Y. Antimutagenicity and mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese miso. *J Sci Food Agric* 1992; 58(3): 395.

Fig. 3. Effect of methanol extracts of raw soybean, cooked soybean and doenjang on the mutagenesis of aflatoxin B₁ in *Salmonella typhimurium* TA98 strain.

Fig. 4. Effect of methanol extracts of various soybean fermented foods on the mutagenesis of aflatoxin B₁ in *Salmonella typhimurium* TA100 strain. The vertical bars represent one standard deviation of three samples. *Commercial doenjang with potassium sorbate as a preservative.

Fig. 5. Growth inhibitory effects of the extracted fractions from doenjang on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells after 6 days of incubation(FCS 10%): ME (methanol extract), HF(hexane fraction), CF(chloroform fraction), EF(ethyl acetate fraction), BF(butanol fraction), AF(aqueous fraction).

Fig. 7. Hexane extract of doenjang induces loss of cyclin B₁ mRNA in MCF-7 human breast carcinoma cells.

Table 3. The inhibitory effect of boiled doenjang stew on aflatoxin B₁(0.5 µg/plate) mediated mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Conc.	Revertants /plate	Inhibition rate
Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)		1150±126	-
Spontaneous		119±9	-
AFB ₁ +MeOH ext. of doenjang stew	25%	428±3	80
	50%	365±26	83
	100%	249±40	91

*The inhibition rate of methanol extract of doenjang(50%) to AFB₁ was 93%

Table 4. Boiling¹ effect of doenjang soup on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.5 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Conc.	Revertants/plate	
		5 min	15 min
AFB ₁ (control)		1550±126	-
Spontaneous		119±9	-
AFB ₁ +MeOH ext. of deonjang soup	25%	318±8(86) ²	395±47(81)
	50%	282±12(89)	257±4(90)
	100%	251±12(91)	213±1(91)

¹Boiling time: The time required after beginning of the boiling.

²The values in parenthesis are inhibition rate(%).

Table 5. Antitumor activities and life span extension of hexane, methanol extracts and boiling extract from doenjang in Balb/c mice with sarcoma 180 cells.

Sample	Dose (mg/kg)	Tumor weight(g)	Survival time(day)
Control	5	3.28±0.29	20.8±3.6
Hexane ext.	5	1.18±0.15(64.0)*	32.9±3.7(58.2)**
Methanol ext.	5	0.68±0.29(79.3)	34.6±0.8(66.3)
Boiling ext.	5	1.65±0.18(49.7)	28.9±2.7(38.9)

*Inhibition rate

**Prolongation rate

Table 1. Aflatoxins found in soy paste, soy sauce and charcoal, and pH changes of the brine and water in the mixtures after 1 month of ripening of the fermented meju¹.

Soybean variety		Aflatoxin (µg/pint jar)							
		AP(brine) ²		AP+AO+BS(brine) ³		AP(water)		AP+AO+BS(water)	
		B ₁	G ₁	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁	B ₁	G ₁
Jangyeop	Soy paste	1418	2837	1069	2266	34.2	19.5	46.5	0.9
	Soy sauce	48.2	103.6	12.8	11.4	13.7	ND ⁴	6.5	ND
	Charcoal	3.1	6.2	0.9	1.3	26.2	27.3	1.8	0.1
	Total	1493.3	2946.8	1082.7	2278.7	74.1	46.8	54.8	1.0
	Degradation(%)	69.3	83.8	23.5	45.8	98.5	99.7	96.1	100
	pH ⁵	5.1±0.5		6.1±0.3		7.3±0.3*		9.9±0.1*	
Danyeop	Soy paste	6233	18436	1394	6470	33.0	36.0	49.0	5.1
	Soy sauce	27.6	0.1	11.2	29.4	89.0	25.0	16.2	5.0
	Charcoal	14.5	7.9	5.6	9.0	8.4	7.0	8.1	2.7
	Total	6275.1	18444.0	1410.8	6508.4	130.4	68.0	73.3	12.8
	Degradation(%)	2.1	52.5	6.4	31.1	98.0	99.8	95.1	99.9
	pH	6.8±0.4		5.9±0.2		8.5±0.7*		7.8±0.7*	

¹ The meju cakes were fermented by traditional method¹⁷⁾.

² The AFB₁ and AFG₁ contents of the meju cake fermented by *A. parasiticus*(AP) for 1 month prior to the ripening were 4857 µg and 18168 µg when meju cakes were made with var. Jangyeop and 6411 µg and 38845 µg with var. Danyeop, respectively.

³ The AFB₁ and AFG₁ contents of the meju cakes fermented by a mixed culture of *A. parasiticus* + *A. oryzae* + *B. subtilis*(AP+AO+BS) for 1 month prior to the ripening were 1416 µg and 4141 µg when meju cakes were made with var. Jangyeop and 1507 µg and 9447 µg with var. Danyeop, respectively.

⁴ None detected.

⁵ The pH values were mean±SD for 3 determinations and those marked with an asterisk beside the pH of water samples are significantly different from those of brine samples at P<0.05 level

Table 2. Degradation of aflatoxin B₁ in the presence of different concentration of ammonia during incubation at 30°C

Incubation time(hrs)	NH ₃ (%)	Aflatoxin B ₁ stability(%) ¹			
		0	0.05	0.1	0.5
2		100 ±0.352	4.5 ±0.78	2.5±0.10	3.0±0.04
4		99.8±0.01	2.4 ±0.12	1.2±0.00	1.1±0.02
6		99.2±0.20	3.4 ±0.15	0.9±0.00	0.9±0.00
24		100 ±0.04	0.02±0.04	ND ³	ND

¹Percentage of aflatoxin B₁ left ammonia treatment.

²Values shown means±standard deviations of three determinations.

³Not detected

Fig. 1. Aflatoxin B₁(○--○,●--●) and G₁(△--△,▲--▲) production by single culture of *A. parasiticus*(AP) and mixed culture of *A. parasiticus* + *A. oryzae* + *B. subtilis*(AP+AO+BS) on meju cakes made with soybean varieties of Jangyeop(panel A) and Danyeop(panel B) by traditional fermentation method. Open symbols(○,△) indicate aflatoxins produced in the presence of sunlight and closed symbols(●,▲) indicate aflatoxins produced in the dark. Each data point is the mean±SD for 3 samples and those asterisked beside closed symbols differ significantly from the open symbols by Student's t test (p<0.05).

Fig. 2. Aflatoxin B₁(○--○) and G₁(△--△) present during ripening of fermented meju, brine and charcoal mixtures. The meju samples were fermented by single culture of *A. parasiticus*(AP) and mixed culture of *A. parasiticus* + *A. oryzae* + *B. subtilis*(AP+AO+BS) on meju cakes made with soybean varieties of Jangyeop(panel A) and Danyeop(panel B) by traditional fermentation method. Each data point is the mean±SD for 3 samples.

Fig. 6. Effect of hexane extract of doenjang on the levels of cyclin A, B₁ and cdc 2 protein in MCF-7 human breast carcinoma cells.