

청국장암의 암예방 증진 연구

-발효기간과 부재료의 양을 달리하여 제조한 청국장의 항돌연변이 효과-

창원전문대학 식품조리과, ¹부산대학교 식품영양학과, ²경남정보대 식품과학계열

권은영 · 정근옥¹ · 문숙희² · 박건영¹

Studies on Enhancing Chemopreventive Effect of *Chungkookjangs*

-Antimutagenic Activity of *Chungkookjangs* Prepared with the Different
Fermentation Periods and Ingredient Ratio-

Eun-Young Kwon, Keun-Ok Jung¹, Suk-Hee Moon² and Kun-Young Park¹

Department of Food Preparation, Changwon College, Changwon 641-771, Korea,

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University,

Busan 609-735, Korea, ²Subdivision of Food Science, Kyungnam College of Information
and Technology, Busan 616-701, Korea

Antimutagenic effects of *chungkookjang* prepared with the different fermentation periods and ingredient ratio were studied against aflatoxin B₁ (AFB₁) using Ames test and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) using SOS chromotest. The fermented *chungkookjang* exhibited higher antimutagenic effect than raw soybeans or non-fermented *chungkookjang* in the Ames test using *Salmonella typhimurium* TA100. Three day-fermented *chungkookjang* showed the highest inhibitory effect on the mutagenicity induced by AFB₁ among the *chungkookjang* samples. MNNG induced SOS response of the *E. coli* PQ37 was also blocked by fermented *chungkookjang* in the SOS chromotest; however, there was no difference on the antimutagenic activity according to the fermented days. The *chungkookjang* mixed with red pepper powder (RPP) and garlic had the strong inhibitory effects on the mutagenicity induced by AFB₁, while only salt added *chungkookjang* showed low inhibition rate in the Ames test. The *chungkookjang* prepared with 1.1% RPP and 1.1% garlic showed the highest antimutagenic effect against MNNG in the SOS chromotest. The functional *chungkookjang* fermented with soybean variety of *manrikong* and *B. licheniformis* for 3 days at 40°C and mixed with 7.9% salt, 1.1% RPP and 1.1% garlic exerted higher antimutagenicity than the *chungkookjangs* prepared traditionally or by modified method in the Ames test. The functional *chungkookjang* showed similar inhibitory effect to *doenjang* on the SOS response induced by MNNG. These results indicate that fermentation periods and ingredient ratio as well

as variety of soybean and starter culture differentiate the degrees of the antimutagenicity of the manufactured final *chungkookjang*.

Key Words: *Chungkookjang*, Fermentation period, Ingredient ratio, Ames test, SOS chromotest

서 론

청국장은 콩을 삶아서 실이 나게 띄워 소금, 고춧가루, 마늘 등의 향신료를 함께 섞어 마쇄하여 후숙한 것으로서 간장, 된장, 고추장과는 달리 장류 중 유일하게 무염하에서 숙성(2~3일)으로 고온(40~50°C)에서 발효시킨 것이다.¹⁾ 청국장은 발효과정 중에 고초균(*Bacillus subtilis*)나 납두균(*Bacillus natto*) 등이 생산하는 효소에 의해서 그 특유의 구수한 맛과 냄새를 내는 동시에 근적근적한 점질물이 생성되며, 대두 단백질이 분해되어 가용성 질소화합물인 peptone, polypeptide, amino acid, amide 등이 생성된다.²⁾ 또한 청국장은 콩으로부터 유래된 trypsin inhibitor,^{3~5)} isoflavone,^{6,7)} phytic acid,⁸⁾ saponin,⁹⁾ lignan¹⁰⁾과 비타민 E¹¹⁾ 및 불포화지방산¹²⁾ 등의 항암활성물질을 다량 함유하고 있기 때문에 기능성 식품으로서 그 중요성이 재조명되고 있다.

한편 발효과정에서 청국장과 비슷한 일본의 낫또(납두, natto)는 *Bacillus natto* 균을 순수하게 배양한 것으로 증자대두에 낫또균을 살포하여 용기를 봉해 40~50°C의 발효실에서 16~24시간 발효시켜 제조한다. 청국장은 소금, 마늘, 고춧가루, 파 또는 생강 등을 넣어 마쇄한 다음 이를 후숙시켜 저장성을 갖게 한 점이 낫또와는 다르며 그 식용방법도 청국장은 찌개로 끓여 먹는 반면 낫또는 간장이나 겨자와 곁들여 저어서 아침이나 저녁 식사때 주식인 밥과 함께 그대로 먹는 것이 일본에서 일반적으로 식용하는 방법이다.¹²⁾

청국장은 발효숙성기간이 짧은 숙성장이기 때문에 전통적으로 콩을 수확한 뒤 늦가을부터 초봄 사이에 각 가정에서 손쉽게 제조 이용하여 왔다. 그러나 청국장은 각 지방 또는 가정마다 제조방법이 일정하지 않으며 그 품질 또한 원료의 종류, 벗집에 부착된 고초균의 종류, 숙성온도 및

기간, 통기상태, 식염농도 등 발효기법상의 차이에 따른 특유의 풍미의 우열이 청국장의 품질을 결정하는 가장 큰 요인이 되고 있다. 이에 권¹⁴⁾은 고서 및 각종 문헌, 조리서에 명시된 제조방법을 체계적으로 정리하여 전통청국장과 개량식 청국장의 제조법을 표준화하였고 이를 기본으로 대두 품종, 증자방법, starter, 발효기간, 부재료배합비를 달리하여 청국장을 제조한 다음 이화학적 실험을 행하여 청국장의 제조방법을 표준화하였다. 또한 Ames test와 SOS chromotest에서 콩품종과 starter를 달리하여 제조된 청국장의 항돌연변이 효과를 비교한 결과 소립종(준저리)이나 중립종(만리콩)을 이용한 청국장과 starter 균주를 이용한 청국장이 돌연변이 유발억제효과가 높았다.¹⁵⁾

본 연구에서는 발효기간과 부재료의 배합비를 달리한 청국장의 항돌연변이 효과를 비교하고 이 결과를 바탕으로 만리콩과 *Bacillus licheniformis* 균주를 이용하면서 발효기간과 부재료의 배합비를 최적화한 암예방 기능성 청국장을 제조하여 전통청국장, 개량식 청국장, 된장 및 natto와 함께 항돌연변이 효과를 비교하였다.

재료 및 방법

1) 시료

(1) **된장 및 natto:** 된장(전통 재래식 된장)은 문옥례식품(순창, 전북)으로부터, natto는 (주)다이에(신포, 일본)에서 제조된 것을 부산 국제시장에서 구입하여 사용하였다.

(2) 청국장의 제조

① **원료대두;** 중립종인 만리콩(100립중 20 g, 조단백질 41%, 조지방 20%)을 수원의 작물시험장에서 분양 받아 청국장 제조 재료로 사용하였다.

② **청국장 제조용 증균 및 배양;** 공시균주는

Bacillus subtilis (KCCM 11315)로 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였으며 제주에서 분리한 *Bacillus licheniformis* CN-115¹⁶⁾ 균주는 영남대 식품가공학과에서 분양받아 사용하였다. 균은 glucose 0.5%를 첨가한 NB배지(Difco, nutrient broth : beef extract 0.3%, peptone 0.5%)에 균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 균체 농도를 조절(흡광도 600 nm=0.8)하여 종균액으로 사용하였다.

③ **청국장의 제조**; 본 실험에 사용한 청국장은 문헌에 의해 표준화된 방법(개량식 청국장)으로 제조하였다.¹⁴⁾ 먼저 대두를 정선 및 수세하여 1.5배의 물(15°C)에 12시간 침지하고 물빼기를 하였다. 이를 Erlenmeyer flask에 담아 고압 멸균기(1.0~1.5 kg/cm²)에서 60분 동안 증자하여 50°C로 냉각하였다. 전배양한 종균액(*B. subtilis* KCCM 11315, 흡광도 600 nm=0.8)을 원료대두의 1% (v/w) 접종하고 40°C incubator에서 72시간 발효시켰다. 발효가 끝난 청국장 배주에 소금을 7.6% 첨가하여 혼합·마쇄하여 본 실험에 사용하였다. 또한 전통 청국장은 증자 시 상압에서 4시간 삶고 냉각한 후 5~7 cm로 절제한 벗질을 깐 상자에 3 cm 두께로 대두를 깔고 그 위에 벗질을 덮어 발효시켰다. 발효가 끝난 후 소금 7.93%, 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가하여 혼합·마쇄하고 5°C에서 15일간 후숙시켰다. 암예방 기능성 청국장의 제조방법은 만리콩을 정선 및 수세하여 1.5배의 물(15°C)에 12시간 침지한 후 물빼기를 하였다. 이후 autoclave (1.0~1.5 kg/cm²)를 이용하여 60분 증자하고 50°C로 냉각하였다. 전 배양한 종균액(*B. licheniformis* CN-115)을 원료대두의 1% (v/w)를 접종하고 40°C에서 72시간 발효하여 소금 7.9%, 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가하여 혼합·마쇄하였다.

④ **발효기간을 달리한 청국장의 제조**; 전 배양한 종균액(*B. licheniformis* CN-115)을 원료대두의 1% (v/w)로 접종하여 40°C에서 0일, 3일, 5일간 발효시킨 청국장과 40°C에서 3일 발효 후 5°C에서 15일간 후숙한 청국장을 제조하였다.

⑤ **부재료 첨가량을 달리한 청국장의 제조**; 소금, 고춧가루, 마늘의 첨가농도를 문헌에 의한 표준값을 기초로 하고 표준편차 만큼의 첨가농도를 각각 달리하여 적절한 배합비를 결정하였다. 청국장 100에 대하여 소금의 농도는 7.9%로 하고 고

춧가루와 마늘을 각각 0.2%, 1.1%, 2.0%로 첨가하여 조절하였다.

(3) **시료조제 및 추출**: 동결건조시킨 시료를 마쇄하여 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복한 후 여과하여 회전식 진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이들 추출물들은 증류수에 희석하여 실험에 사용하였다.

2) Ames 돌연변이 유발 실험

(1) **실험균주 및 돌연변이 유발물질**: *Salmonella typhimurium* TA98 및 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 aflatoxin B₁(AFB₁)과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하여 각각 DMSO 및 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

(2) **시료의 독성실험 및 돌연변이 유발물질의 농도 결정**: 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 100μl(1~2×10⁹ cells/ml)와 시료를 첨가하고 가볍게 vortex한 후 nutrient agar plate에 분주, 고화시켜서 37°C에서 24시간 배양시킨 다음, 그 독성유무를 판정하였다.^{17,18)}

(3) **항돌연변이 효과실험**: 간접 돌연변이원(AFB₁)을 활성화시키기 위하여 Maron과 Ames의 방법^{17,18)}에 따라 S9 mixture를 첨가하였다. S9 mixture는 쥐의 간으로부터 얻은 S9 fraction 10%에 MgCl₂-KCl salts (2%), 1 M glucose-6-phosphate (0.5%), 1 M NADP (4%), 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) 및 멸균수를 혼합하여 S9 mixture를 조제하였다. 항돌연변이 실험은 preincubation mutagenicity test¹⁹⁾를 이용하여 미리 건열 멸균시킨 cap test tube에 S9 mixture 0.5 ml (간접 돌연변이원인 경우) 혹은 인산 완충액 0.5 ml (직접 돌연변이원인 경우), 하

룻밤 배양된 균주 0.1 ml ($1-2 \times 10^9$ cells/ml)와 돌연변이 유발물질(50 μ l) 및 희석된 된장 시료(50 μ l)를 가하여 37°C에서 20분간 예비 배양한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar (45°C) 2 ml씩을 가하고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant 숫자를 계수하였다.

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

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

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

3) SOS chromotest

(1) **돌연변이 유발물질**: 직접돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하여 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

(2) **항돌연변이 효과 실험**: Quillardet의 방법을 변형시킨 백과 함²⁰⁾의 방법을 사용하였다. 냉동보관된 균주 50 μ l를 5 ml의 L medium에 접종하고 37°C에서 흡광도가 0.3~0.4에 이를 때까지 2시간 동안 진탕 배양시킨 후, 여기서 얻은 균주를 L medium에 1/10로 희석하였다. 각 농도별로 준비된 시료와 돌연변이 유발물질이 혼합된 것 20 μ l를 미리 분주해 둔 96 well plate의 각 well에 위의 희석된 균주 100 μ l씩 분주하고 90분간 37°C에서 진탕 후 SOS 반응을 유도한 후 한쪽에는 β -galactosidase의 활성 측정을 위해 ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) 100 μ l, 다른 쪽에는 alkaline phosphatase의 활성 측정을 위해 PNPP (*p*-nitrophenyl phosphate disodium) 100 μ l를 첨가하였다. 발색 시간은 10분으로 하였으며 β -galactosidase는 1.5 M Na₂CO₃ 100 μ l, alkaline phosphatase는 1 M HCl 50 μ l로 효소에 의한 발색반응을 정지시키고 5분 후 alkaline phosphatase쪽에 50 μ l의 2 M Tris buffer를 첨가하여 HCl을 중화하고 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 O.D. 420 nm

값은 Miller²¹⁾의 공식에 의해 enzyme unit (Eu)값을 구하였다.

$$\text{Eu} = \frac{(1000 \times A \dots)}{t \text{ (min.)}}$$

4) 통계분석

실험 data로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석을 행하였다.

결 과

1) 발효기간을 달리한 청국장의 항돌연변이 효과

발효기간을 달리하여 제조한 청국장의 메탄올 추출물로 Ames test를 실시하여 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 비교하였다(Table 1). 발효한 청국장은 발효하지 않은 청국장이나 생콩보다 높은 돌연변이 유발억제효과를 보였으며, 발효하지 않은 청국장은 생콩보다도 낮은 항돌연변이 효과를 보였다. 1.25 mg/plate 농도에서는 발효된 청국장간의 항돌연변이 효과의 차이가 없었으나 3일 발효시킨 청국장의 항돌연변이 효과가 가장 높아 2.5 mg/plate 농도에서 54%의 돌연변이 유발억제효과를 나타내었다($p < 0.05$). SOS chromotest를 이용하여 MNNG에 대한 청국장의 SOS 반응억제효과를 측정한 결과(Table 2) 발효된 청국장들은 생콩이나 발효하지 않은 청국장에 비해 높은 SOS 반응억제효과를 보였으며 발효기간이 다른 청국장간에는 항돌연변이효과가 큰 차이를 보이지 않았다.

2) 부재료의 함량을 달리한 청국장의 항돌연변이 효과

부재료의 첨가에 따른 청국장의 암예방효과를 측정하기 위해 고춧가루와 마늘의 첨가량을 달리하여 제조한 청국장의 메탄올 추출물로 Ames test를 실시하여 AFB₁에 대한 항돌연변이 효과를 측정하였다(Table 3). 고춧가루와 마늘을 첨가하여 제조한 청국장은 소금만을 첨가하여 제조한 청국장보다 항돌연변이효과가 높았으며, 고춧가루 1.1%,

Table 1. Effect of methanol extracts from *chungkookjangs* on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.5 μ l/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Concentration (mg/plate)	Revertant/plate	
		1.25	2.5
Spontaneous		141 \pm 23	141 \pm 23
AFB ₁ (Control)		996 \pm 56 ^a	996 \pm 56 ^a
AFB ₁ +Raw soybean		761 \pm 44 ^c (27) ²⁾	678 \pm 42 ^d (37)
+0day-fermented CKJ ¹⁾		861 \pm 38 ^b (16)	762 \pm 39 ^c (27)
+3day-fermented CKJ		683 \pm 65 ^c (37)	532 \pm 11 ^c (54)
+5day-fermented CKJ		691 \pm 76 ^c (36)	845 \pm 35 ^b (18)
+3day-fermented & 15day-ripened CKJ		723 \pm 8 ^c (32)	963 \pm 28 ^a (4)

¹⁾*Chungkookjang*²⁾The values in the parantheses are inhibition rate (%)^{a-d}Means with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test**Table 2.** SOS response of methanol extracts from *chungkookjang* (250 μ g/assay) against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 70 ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment	β -galactosidase (β)		Alkaline phosphate (a)		β/a	R ²⁾	Inhibition rate (%)
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit			
Spontaneous	0.359 \pm 0.030	12.0	0.234 \pm 0.008	7.80	1.53	1.0	-
MNNG (control)	0.896 \pm 0.028	29.9	0.233 \pm 0.006	7.77	3.84	2.51	-
MNNG+Raw soybean	0.769 \pm 0.032	25.6	0.224 \pm 0.012	7.47	3.43	2.24	18
+0day-fermented CKJ ¹⁾	0.852 \pm 0.037	28.4	0.258 \pm 0.006	8.60	3.30	2.16	14
+3day-fermented CKJ	0.756 \pm 0.016	25.2	0.271 \pm 0.034	9.03	2.79	1.82	46
+5day-fermented CKJ	0.654 \pm 0.060	21.8	0.241 \pm 0.018	8.03	2.71	1.77	49
+3day-fermented & 15day-ripened CKJ	0.803 \pm 0.054	26.8	0.281 \pm 0.003	9.37	2.86	1.87	42

¹⁾*Chungkookjang*²⁾R = $\frac{\beta\text{-galactosidase units}}{\text{Alkaline phosphatase units}}$

마늘 1.1%를 첨가하여 제조한 청국장과 고춧가루 2.0%, 마늘 0.2%를 첨가하여 제조한 청국장이 다소 높은 돌연변이유발억제효과를 보였다. SOS chromotest를 이용하여 MNNG에 대한 부재료의 양을 달리한 4종류의 청국장의 SOS 반응 억제효과를 측정된 결과 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가하여 제조한 청국장이 가장 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다(Table 4). 이상의 결과로부터 암예방 기능성 증진 면에서 청국장의 부재료 첨가 비

율은 소금 7.9%, 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%가 가장 우수함을 알 수 있었다.

3) 기능성 청국장의 항돌연변이효과

AFB₁을 이용한 Ames test에서 전통식 청국장은 개량식 청국장보다 항돌연변이 효과가 높았으며, 암예방 기능성 청국장은 개량식 청국장보다 2배 이상 높은 돌연변이유발 억제효과를 보여 청국장 중에서 항돌연변이 효과가 가장 높았다($p < 0.05$, Table 5).

Table 34. SOS response of *Escherichia coli* from *Lactococcus lactis* (250 µg/assay) subinoculated to *Salmonella typhimurium* (MNNG, 70 ng/assay) in *E. coli* PQ37

Treatment (β) Treatment	β-galactosidase		Alkaline phosphatase (ant)/plate		-β/a	R ⁴⁾	Inhibition rate (%)
	Concentration (mg/plate)	OD ₄₂₀ Unit	OD ₄₂₀ Unit	Unit			
Spontaneous		0.359±0.030	12.0	0.234±0.008	7.80	1.53	141±23 -
MNNG (Control)		0.896±0.028	29.9	0.263±0.006	7.77	3.84	99±56 ^a -
MNNG+Salt ¹⁾ CKJ ²⁾		0.803±0.054	26.8	0.278±0.006 ⁴⁾	9.37	2.86	1087±46 ^a (42)
+Salt+1.1%RPP ³⁾ CKJ		0.716±0.025	23.9	760±20 ^c (28)	9.00	2.65	621±25 ^b (44)
+Salt+2.0%RPP CKJ				770±12 ^c (27)			648±31 ^b (41)
+Salt+0.2%RPP CKJ		0.749±0.038	25.0	861±47 ^b (16)	8.83	2.83	680±57 ^b (37)
+0.2%Garlic CJK				0.265±0.009			1.85 (43)
¹⁾ 7.9% +Salt+0.2%RPP							
²⁾ Chungkookjang		0.773±0.053	25.8	0.264±0.003	8.80	2.93	1.92 39
³⁾ +2.0%Garlic CJK							

¹⁾The % values in the parantheses are inhibition rate (%)

²⁾Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test

³⁾RPP: Red pepper powder

$$R = \frac{\beta - \text{galactosidase units}}{\text{Alkaline phosphatase units}}$$

또한 기능성 청국장은 2.5 mg/plate 농도에서는 된장 (65%)과 비슷한 63%의 항돌연변이 효과를 보였으며 낮또 시료보다도 효과가 컸었다. MNNG를 이용한 SOS chromotest에서도 Ames 실험계에서와 유사한 효과를 보여 기능성 청국장이 전통식 청국장이나 개량식 청국장보다 높은 SOS 반응억제효과를 보였다(Table 6). 이상의 결과로부터 암예방 기능성 청국장의 항돌연변이 효과는 이미 암예방효과가 검증된 된장과 유사하게 우수함을 알 수 있었다.

고 찰

찜 콩을 40°C에서 3일, 5일간 발효하여 제조한 청국장과 40°C에서 3일간 발효한 후 5°C에서 15일간 후숙하여 제조된 청국장의 항돌연변이 효과

Table 5. Effect of methanol extracts from *chungkookjangs* and other soybean products on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁ (AFB₁, 0.5µl/plate) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Concentration (mg/plate)		Revertant/plate	
	1.25	2.5		
Spontaneous	141±23			
AFB ₁ (Control)	996±56 ^a			
AFB ₁ +T-CKJ ¹⁾	831±69 ^{bc} (19) ⁴⁾	650±51 ^c (40)		
+M-CKJ ²⁾	915±13 ^{ab} (9)	763±48 ^b (27)		
+F-CKJ ³⁾	729±21 ^c (31)	454±7 ^d (63)		
+Doenjang	625±84 ^d (43)	444±71 ^d (65)		
+Natto	777±58 ^c (26)	504±59 ^d (58)		

¹⁾Traditionally prepared *chungkookjang*
²⁾*Chungkookjang* prepared with modified method
³⁾Functional *chungkookjang*
⁴⁾The values in the parantheses are inhibition rate (%)
^{a-d}Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test

를 비교한 결과 Ames test에서 발효한 청국장이 생콩이나 찜콩보다 돌연변이유발억제효과가 높았다. 3일간 발효한 청국장의 항돌연변이 효과가 가장 높았으며 5일간 발효한 청국장과 3일간 발효한 후 15일간 후숙한 청국장은 1.25 mg/plate 농도에서 보다 2.5 mg/plate의 농도에서 항돌연변이효과가 낮았다. Ames 실험계에서 histidine첨가량을 높이면 돌연변이 유발이 증진되는데 청국장은 발효과정을 통해 histidine함량이 높아지므로 histidine이 복귀돌연변이수를 증가시켰을 가능성이 있다. 따라서 시료에 함유된 histidine에 의해 영향을 받지 않는 SOS chromotest에서의 보돌연변이 효과를 살펴보기 위해 *E. coli*의 변이주인 PQ37을 이용하여 MNNG에 대한 보돌연변이 실험을 하였다. SOS chromotest에서도 생콩이나 찜콩보다는 발효한 청국장들의 항돌연변이 효과가 높았으며 발효된 청국장들의 SOS 반응 억제효과는 큰 차이가 없었다.

고²²⁾는 원료인 콩과 발효하지 않은 청국장 및 발효한 청국장의 항돌연변이 효과를 비교한 결과 찜 콩에 양념을 첨가하여 발효하지 않은 것은 생콩보다도 낮은 항돌연변이 효과를 보였고, 발효된 청국장은 생콩보다 높은 활성을 나타내어 청국장을 발효시키는 과정에서 발효산물들이 효과적으로 항돌연변이성을 나타내는 것으로 보인다고 하

Table 6. SOS response of methanol extracts from *chungkookjangs* and other soybean products against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 70 ng/assay) in *E. coli* PQ37

Sample	β-galactosidase (β)		Alkaline phosphate (a)		β/a	R ⁴⁾	Inhibition rate (%)
	OD ₄₂₀	Unit	OD ₄₂₀	Unit			
Spontaneous	1.357±0.028	45.2	0.761±0.006	25.4	1.78	1.0	-
MNNG (Control)	2.573±0.048	85.8	0.779±0.032	26.0	3.30	2.51	-
MNNG+T-CKJ ¹⁾	2.014±0.025	67.1	0.742±0.021	24.7	2.72	1.53	65
+M-CKJ ²⁾	2.171±0.016	72.4	0.778±0.034	25.9	2.80	1.57	62
+F-CKJ ³⁾	2.090±0.027	69.7	0.832±0.021	27.7	2.52	1.42	72
+Doenjang	2.191±0.083	73.0	0.920±0.054	30.7	2.38	1.34	77
+Natto	2.016±0.035	67.2	0.770±0.001	25.7	2.61	1.47	69

¹⁾Traditionally prepared *chungkookjang*
²⁾*Chungkookjang* prepared with modified method
³⁾Functional *chungkookjang*
⁴⁾R = $\frac{\beta\text{-galactosidase units}}{\text{Alkaline phosphatase units}}$

였다. 이 결과로 볼 때 청국장은 발효에 의해서 항돌연변이 효과가 증진되며 발효기간에 따른 차이는 크게 나지 않는 것으로 보인다. 권¹⁴⁾은 청국장을 40°C에서 발효시켰을 때 4일이 지나면 청국장 특유의 점질물을 생성하는 효소인 γ -GTP의 활성이 급격히 감소하면서 암모니아태 질소가 크게 증가하여 풍미를 손상시킨다고 하였다. 따라서 맛과 기능성을 모두 고려해 볼 때 청국장의 발효기간은 40°C에서 3일이 적당한 것으로 보인다.

청국장의 제조법에서 재래식 청국장은 고춧가루와 마늘 등의 부재료를 첨가하여 절구에서 굵고 균일하게 찼어 항아리에 담아 서늘한 곳(5~10°C)에서 후숙을 시키며, 개량식 청국장은 소금만을 첨가하여 혼합·마쇄한 후 숙성과정을 생략하여 유통시킨다고 알려져 있다.^{23~25)} 권¹⁴⁾은 부재료의 표준화 과정에서 사용빈도가 30% 이상인 부재료는 고춧가루와 마늘이었으며, 첨가량은 모두 1.1±0.9%이었다고 하였다. 이를 바탕으로 고춧가루와 마늘의 첨가량을 달리한 청국장을 제조하여 Ames test와 SOS chromotest를 실시하였다. 두 실험계에서 모두 소금만을 첨가한 청국장보다 고춧가루와 마늘을 첨가한 청국장이 항돌연변이 효과가 높았고 마늘보다는 고춧가루가 많이 함유된 청국장에서 돌연변이유발억제효과가 높았으며 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가한 청국장이 가장 항돌연변이 효과가 높았다(Table 3, 4).

김 등²⁶⁾은 고춧가루는 TA100과 TA98균주에 대해서 모두 직접적인 돌연변이 유발성이 없었고 MNNG에 대한 보돌연변이 효과도 없었으며, TA100 균주에서 AFB₁에 대해 돌연변이유발억제효과를 나타내었다고 하였다. 이러한 효과는 고추의 매운 맛 성분인 capsaicin, 비타민 C와 carotenoids 등에 의한 것이라고 알려져 있다.^{27~30)} 또한 고추의 씨에는 필수지방산이며 ω -6 불포화지방산인 linoleic acid를 64% 함유되어 있으며³¹⁾ 고추씨는 특히 aflatoxin B₁과 MNNG 등 돌연변이/발암물질 등에 대해 항돌연변이 효과가 있다고 보고된 바 있다.²⁸⁾ 마늘의 항돌연변이 효과도 알려져 있는데 마늘의 메탄올추출물과 분획물들은 aflatoxin B₁과 MNNG에 대해 항돌연변이 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다.³²⁾ 마늘의 이러한 항돌연변이 기작은 간의 microsomal 효소계의 활성화에 관여하여 gluta-

thione S-transferase활성 및 SH 함유 화합물들을 증가시킴으로써 최종 돌연변이원을 비독성물질로 전환시키는 것으로 알려져 있다.³³⁾ 따라서 청국장 제조시 고춧가루와 마늘을 첨가하므로써 청국장의 풍미를 증진시키면서 암예방효과를 높일 수 있을 것으로 보인다.

본 연구실에서는 고서 및 각종 문헌, 조리서에 명시된 제조방법을 체계적으로 정리하여 전통식 청국장과 개량식 청국장으로 표준화한 바 있다.¹⁴⁾ 또한 청국장의 암예방효과를 증진시키기 위해서는 원료대두는 국산 햇콩 중 중립종인 만리콩을 사용하는 것이 좋으며, 위생적이고 재현성이 있으면서 암예방효과가 높은 청국장을 제조하기 위해서는 *B. licheniformis* CN-115와 같은 우수한 종균을 접종하여 청국장을 제조하는 것이 바람직하다고 하였다.¹⁵⁾ 이 연구에서는 만리콩을 사용하고 *B. licheniformis* CN-115를 접종하여 40°C에서 3일간 발효한 다음 소금 7.9%, 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가하여 혼합, 마쇄한 방법으로 암예방 가능성이 우수한 청국장을 제조하여 전통식과 개량식으로 제조된 청국장과 된장 및 낫또와 항돌연변이 효과를 비교하였다. Ames test와 SOS chromotest에서 모두 기능성 청국장이 전통청국장이나 개량식 청국장보다 높은 항돌연변이 효과를 보였으며 기능성 청국장은 된장과 비슷한 돌연변이유발억제효과가 있는 것으로 나타났다.

정 등³⁴⁾은 SOS chromotest에서 콩 및 콩발효식품인 간장, 된장, 고추장, 청국장의 용매추출물(물, 메탄올, hexan추출물)의 직접돌연변이원인 MNNG에 대한 항돌연변이 효과를 비교한 결과 모든 용매추출물에서 청국장이 가장 항돌연변이 효과가 높았으며 된장, 콩, 고추장의 순으로 활성을 보였다고 하였다. 고 등²²⁾은 만리콩을 사용하고 40°C에서 48시간 발효한 후 소금 7%, 고춧가루 2.64%, 마늘 1.19%를 넣어 혼합·마쇄한 다음 20°C에서 20일간 숙성시킨 청국장은 Ames 및 SOS 실험계에서 된장과 비슷한 항돌연변이 효과를 나타내었다고 하였다. 따라서 청국장의 암예방 효과는 콩의 종류, 발효방법, 부재료 등에 따라 달라질 수 있으며 위에서 제조된 기능성 청국장은 이미 암예방효과가 검증된 된장과 비교하여 암예방 가능성이 우수하므로 앞으로 다른 생체

실험 등이 추가된다면 좋은 기능성식품이 될 수 있다고 생각된다.

결 론

발효기간을 달리하여 제조한 청국장항의 항돌연변이 효과는 발효기간에 따라 큰 차이를 보이지 않아 맛과 풍미를 고려할 때 40°C에서 3일간 발효하는 것이 가장 바람직 한 것으로 보인다. 부재료를 달리 첨가하여 제조한 청국장은 소금 7.9%, 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가하였을 때 항돌연변이 및 항암효과가 높았다. 기능성 청국장의 제조방법은 만리콩을 정선 및 수세하여 1.5배의 물(15°C)에 12시간 침지한 후 물빼기하였다. 이후 autoclave (1.0~1.5 kg/cm²)를 이용하여 60분 증자하고 50°C로 냉각하였다. 전 배양한 종균액(*B. licheniformis* CN-115)을 접종하여 40°C에서 72시간 발효하여 소금 7.9%, 고춧가루 1.1%, 마늘 1.1%를 첨가하여 혼합·마쇄하였다. 이렇게 제조된 기능성 청국장은 항돌연변이 실험과 *in vitro* 항암실험에서 항암효과가 입증된 된장과 유사한 저해효과를 보였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 대구대학교 농산물저장·가공 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고 문헌

- 1) 김진숙, 유선미, 최정숙, 박홍주, 홍선표, 장창문. 전통 청국장의 이화학적 특성. 한국농화학회지 1998; 41: 377-383.
- 2) 장창문. 청국장의 품질 특성. 농촌생활과학 1996; 17: 52-57.
- 3) Kennedy AR. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J Nutr* 1995; 125: 733s-743s.
- 4) Kennedy AR and Little JB. Effects of protease inhibitors on radiation transformation *in vitro*. *Cancer Res* 1981; 41: 2103-2108.
- 5) Kuroki T and Drevon C. Inhibition of chemical transformation in C3H/10T1/2 cells by protease in-

- hibitors. *Cancer Res* 1979; 39: 2755-2761.
- 6) Adlercreutz CHT, Goldin BR, Gorbach SL, Watanabe S, Hämäläinen EK, Markkanen MH, Höckerstedt KAV, Mäkelä TH, Wähälä KT, Hase TA and Fotsis T. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 1995; 125(3 Suppl): 757s-770s.
- 7) Jing Y and Waxman S. Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones. *Anticancer Res* 1995; 15: 1147-1152.
- 8) Shamsuddin AM. Inositol phosphates have novel anti-cancer function. *J Nutrition* 1995; 125: 725s-732s.
- 9) Rao AV and Sung MK. Saponins as anticarcinogens. *J Nutr* 1995; 125: 717s-724s.
- 10) Adlercreutz H. Lignans and phytoestrogens. Possible preventive role in cancer. In: Progress in Diet and Nutrition. Switzerland. 1988; 14: 165.
- 11) Paganelli GM. Effects of vitamin A, C, and E supplementation on rectal cell proliferation in patient with colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 47-51.
- 12) Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC and Bell PRF. Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6-polyunsaturated fats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 2191-2197.
- 13) 이한창. 발효식품. 신광출판사, 1996; pp 108-110.
- 14) 권은영. 청국장 제조의 표준화와 암예방 효과. 부산대학교 대학원 석사학위논문 2000.
- 15) 박건영, 권은영, 정근옥. 청국장의 암예방 증진 연구. 1. 대두 및 starter 종류에 따라 제조된 청국장의 항돌연변이 활성효과. 대한암예방학회지 2001; 6: 36-43.
- 16) 석영란, 김영환, 김 성, 우희섭, 김태완, 이선호, 최청. *Bacillus licheniformis* CN-115 균주를 이용한 청국장 제조과정에서 단백질 아미노산의 변화. 한국농화학회지 1994; 37: 65-71.
- 17) Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
- 18) Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-364.
- 19) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In; Norphth KH and Gamer RC, eds. Short terms for detecting carcinogens. Berling, Springer, 1980; pp 273-285.
- 20) 백창원, 함승시. SOS chromotest에 의한 사과의 효소 갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. 한국식품과학회

- 지 1990; 22: 618-624.
- 21) Miller, J. Experiments in molecular genetics. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1972.
 - 22) 고현숙, 주현규, 정근욱, 박건영. 콩 종류에 따른 청국장의 항돌연변이 효과. 대한암예방학회지 1999; 4: 204-212.
 - 23) 김경자, 유명기, 김상순. 벧짚을 이용한 청국장 제조에 관한 연구. 한국식품과학회지 1982; 14: 301-308.
 - 24) 유진영. 청국장의 산업화 기술의 전망. 식품과학기술지 1997; 10: 84-93.
 - 25) 장창문. 청국장의 품질 특성. 농촌생활과학 1996; 17: 52-57.
 - 26) 김소희, 박건영, 서명자. *Salmonella* assay system에서 고춧가루에 의한 aflatoxin B₁의 돌연변이유발 저해효과. 한국영양식품학회지 1991; 20: 156-161.
 - 27) Morimoto C, Tsujita T, Okuda H. Epinephrine-induced lipolysis in rats fat cells from visceral and subcutaneous sites: role of hormone-sensitive and lipid droplets. *J Lipid Res* 1997; 38: 132-138.
 - 28) 최선미, 전영수, 정근욱, 박건영. 고추의 종류 및 부위에 따른 돌연변이 유발 억제효과. 대한암예방학회지 2001; 6: 108-115.
 - 29) Park JS, Park KY, Yu R. Inhibition of nitrosation by capsaicin and its metabolism. *J Korean Soc Food Nutr* 1998; 27: 1015-1018.
 - 30) 최선미, 전영수, 박건영. 한국산 고춧가루의 품질비교. 한국식품과학회지 2000; 32: 1251-1257.
 - 31) 박재복. 한국고추의 맛에 대한 평가. 한국고추학회지 1996; 4: 75-61.
 - 32) 박건영, 김소희, 서명자, 정해영. 마늘의 돌연변이 유발억제 및 HT-29 결장암세포의 성장저해효과. 한국식품과학회지 1991; 23: 370-374.
 - 33) Kim SH, Park KY, Suh MJ, Chung HY. Effect of garlic (*Allium sativum*) on glutathione S-transferase activity and the level of glutathione in the mouse liver. *J Korean Soc Food Nutr* 1994; 23: 436-442.
 - 34) 정건섭, 윤기도, 홍석산, 권동진. 전통장류의 항돌연변이성 및 항암성 효과. 식품과학기술지 1996; 1: 75-85.
-