Kor. J. Food Hygiene 8(4), 225-230(1993)

2-AF에 의해 유발된 미생물 변이원성에 미치는 들미나리즙의 돌연변이 억제작용

한규석 · 정의호 · 함승시* · 심태흠 · 이택수 · 이해금
강원도 보건환경연구원 *강원대학교 식품공학과

Antimutagenicity of Small Water Dropwort Juice on the Microbial Mutagenicity Induced by 2-Aminofluorene

Kyu-Seok Han, Eui-Ho Cheong, Seung-Shi Ham*, Tae-Heum Shim, Taek-Su Lee, Hae-Keum Lee
Institute of Health and Environment, Kangweon-Do
**Department of Food Science and Technology, Kangweon National University*

ABSTRACT—This study was conducted to examine the stages showing the antimutagenic effects on the microbial mutation by addition of the juice extracted from small water dropwort. It was not able to find out the signal showing the genic derepression or change of gene repair system by addition of the juice. And it was hardly possible to expect the conversion of 2-AF to inactive form by the juice. however the longer 2-AF and S-9 mix were contacted before addition of the juice, the stronger the microbial mutagenisity of 2-AF was, and after addition of the juice, the mutagenicity was decreased rapidly. It seems that some components in the juice act as inhibitor of a enzyme in S-9 mix, and block the conversion of 2-AF to the ultimate mutagen.

Keyword □ Small wator dropwort, Microbial mutation, Antimutagenic effect

최근 여러가지 변이원성 발암물질이 *in vitro* 혹은 *in vivo*에서 확인되고 있으며[1] 이러한 변이원성 발암물질에 대해 억제효과를 나타내는 물질에 대한 연구도 식물성분을 중심으로 활발하게 진행되고 있다.

Kada 등[2]과 Morita 등[3]은 식물체로부터 얻은 시료가 tryptophan 열분해 물질의 변이원성을 실활시킨다고 보고하면서 이들 변이원 억제인자 (desmutagenic factor)는 열이나 protease에 감수성을 갖는 점으로 보아 단백질 관련물질이라 보고하였으며 Scott 등[4]과 Bengni 등[5]은 식물조직이 변이원성물질을 불활성화 시키는 것으로 추정보고하였다. 또한 Yano 등[6]은 야채즙이 N-methyl-N-nitrosourea의 알킬화 활성(alkylating activity)을 감소시킨다고 보고한 바 있다.

Received for publication January 5, 1994
Reprint reguest: K.-S. Han at the above address

한편 oxygen radical이나 지방질 과산화물에 기인되는 변이원성이나 발암성은 식물체내에 존재하는 각종 효소계에 의하여 방어된다는 보고와 vitamin E. β-carotine, chlorophyllin, ascorbic acid 또는 phenol류 등 항산화성을 갖는 식물체 성분에 의하여 방어된다는 보고도 있다.[1,7,8]

최근 함 등[9,10]은 효소적 갈변반응 생성물이 미생물 변이원성을 억제한다고 보고하였으며 이 등[11]은 녹황색 채소류에서 얻은 methanol 추출물에 대하여 돌연변이 억제효과를 확인 보고한 바 있다.

저자 등[12]은 2-aminofluorene (2-AF)과 tryptophane pyrolysate I (Trp-p-1)에 의하여 유발되는 변이원성이 들미나리, 두릅, 쑥 등의 생즙에 의하여 강력하게 억제된다는 실험결과를 보고한 바 있다. 그러나 식물체에서 유래된 시료들의 돌연변이 억제기작에 관한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 생채즙에 의한 미생물 돌연변이

억제기작을 규명하기 위한 기초연구로서, *S. typhimurium* TA98과 TA100을 실험균주로하여 2-AF에 의해 유발되는 돌연변이원성에 대하여 들미나리 생즙의 변이원 억제효과를 실험하면서 변이원물질, S-9 mix, 균 및 들미나리 생즙의 첨가 순서와 반응시간에 따른 변이원 억제효과의 차이를 알아 보았다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 들미나리는 강원도 춘천군 산지에서 구입하여 사용하였으며, 발암물질인 2-aminofluorene은 Sigma사 제품을 구입하여 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. *Salmlonella typhimurium* TA98과 TA100은 일본 국립위생시험소로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

들미나리 생즙의 조제

들미나리의 불순물을 제거한 후 잘게 절단한 다음 가정용 녹즙기로 생즙을 얻고 10,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음 그 상징액을 Nalgene Filter ware (pore size: 0.20 μm)로 여과한 여액을 시료로 사용하였다.

Crystal violet의 확산능 및 막투과성에 미치는 시료의 영향 측정

S. typhimurium TA98의 막투과성에 미치는 미나리즙의 영향을 알아보기 위하여 하루밤 nutrient broth culture에서 배양시킨 균현탁액에 시료를 각각 0, 50, 100, 200 μl 첨가한 다음 미리 조제해 놓은 nutrient agar plate 상에 도포하고 crystal violet 10 μg을 주입시킨 paper disc를 올려 놓고 37℃에서 12시간 배양시킨 후 생육저지대의 크기를 측정하였다.

Antimutagenicity test

변이원물질과 균 및 들미나리즙의 첨가순서와 반응시간에 따른 변이원억제효과의 차이를 알아보기 위하여 *S. tyhpimurium* TA98과 TA100 두 균주를 이용하였으며 Ames 원법을 개량한 preincubation법[13-15]을 적용하였다. 동일한 시료, 동일한 반응시간에 대하여 3개의 plate를 사용하였으며 측정된 colony 수의 평균 값을 취하여 돌연변이 억제효과를 검토하였다. 시료의 농도는 TA98에는 100 μl, TA100에는 50 μl의 시료를 사용하였으며, 2-AF의 농도는 plate 당 10 μg을 첨가하였다. 시료와 2-AF의 농도는 예비실험을 통하여 2-AF에 의하여 유도된 변이원성에 대하여 시료의 돌연변이 억제효과를 측정하기에 적절한 농도로 결정하였다.

Table 1. The effect of the amount of small water dropwort juice on the growth inhibition by crystal violet in *Salmonella typhimurium* TA98

Sample Vol. (μl)	Inhibition zone (mm)	
	Dia.	± SD
0	21.7	± 0.691
50	21.6	± 0.731
100	20.0	± 0.749
200	19.6	± 0.812

결 과

독성 물질의 확산능 및 막투과성의 변화

S. typhimurium TA98의 막투과성이나 2-AF의 확산능에 미치는 미나리즙의 영향을 알아보기 위하여 균액과 시료를 도포한 nutrient agar plate에 crystal violet을 주입시킨 disc를 올려 놓고 배양한 결과 생육저지대(inhibition zone)의 평균직경은 Table 1과 같이 들미나리즙을 첨가하지 않으면 21.7 mm (SD=0.691, n=12)이었고, 시료를 200 μl 첨가하면 19.6 mm(SD=0.812, n=12)로 약간 감소하는 경향을 보였다.

2-AF와 미나리즙의 반응시간에 따른 억제효과의 변화

항변이원성을 발현시키는 기작에 관해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았지만 시료와 발암물질의 화학적 반응에 의하여 변이원성 물질이 불활성화되는 경우도 예측할 수 있다.

따라서 본 실험은 먼저 시료생즙이 2-AF와 세포밖에서 작용하여 변이원성을 상실하므로서 변이원활성을 억제하는가의 여부를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 즉 반응시간을 달리하면서 2-AF와 들미나리즙을 반응시킨 다음 S-9 mix와 균을 첨가하여

Table 2. The effect of 2-AF, sample or S-9 mix reaction time on the microbial mutagenicity

Reaction time (min)	Revertants/plate			
	−S-9 mix		+S-9 mix	
	TA98	TA100	TA98	TA100
0	125	223	151	176
5	135	184	144	208
10	115	204	126	227
20	104	164	155	201
40	113	184	141	195
60	110	192	147	211
2-AF control	2,030	549		
Spontaneous	45	154		

변이원성 억제효과를 관찰하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 2-AF와 들미나리즙의 반응시간에 따른 변이원성 억제효과에는 거의 차이가 없었으며 S-9 mix와 2-AF 그리고 들미나리즙을 미리 반응시켜도 복귀 돌연변이 집락수는 반응시간에 관계없이 동일하였다.

이러한 결과를 보아 들미나리즙의 돌연변이 억제효과를 나타내는 원인이 2-AF와 시료가 반응하여 변이원성 물질이 불활성화 되는 것은 아니라고 생각된다.

들미나리즙과 균체의 접촉시간의 영향

2-AF의 균체막 투과성에 대한 들미나리즙의 영향을 알아보기 위하여 먼저 균체와 들미나리즙을 일정시간 접촉시키고 2-AF를 첨가하여 변이원 억제효과를 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 균체와 들미나리즙의 접촉시간을 증가시켜도 his^+ revertant colony 수의 뚜렷한 증감이 없이 2-AF에 의해 유발된 변이원성에 대하여 TA98에서 약 90%, TA100에서는 약 78%의 억제율을 나타내었다.

들미나리즙의 어떤 성분이 균체막을 차폐하여 2-AF의 균체내 투과성을 감소 시키므로서 변이원성을 억제한다면 들미나리즙의 억제효과는 들미나리즙과 균체의 접촉시간에 어느정도 영향을 받을 것이다. 그러나 균체와 미나리즙의 접촉시간에 관계없이 일정한 억제효과만을 나타낸다는 것은 시료가 균체막을 차폐함으로서 2-AF의 균체흡수를 방해하여 일어나는 억제효과는 아닌 것으로 생각된다.

Table 3. The effect of the cell-sample Preincubation time on the microbial mutagenicity

Contact time (min)	Revertants/plate	
	TA98	TA100
0	164	267
5	170	273
10	160	248
20	178	252
40	133	230
60	147	225
2-AF control	1,435	553
Spontaneous	18	158

균체와 2-AF의 접촉시간의 영향

균체와 2-AF의 접촉시간을 달리하여 반응시킨 다음 미나리즙을 첨가시킨 후 변이원 억제효과를 실험한 결과는 Fig. 1과 같다.

TA98 균주에 2-AF, S-9 mix 및 들미나리즙을 동시에 첨가한 경우에는 복귀돌연변이집락이 272/plate로 양성대조군 2,160/plate에 비하여 현저히 낮았으며 변이원 억제효과는 88%에 달하였다. 그러나 균체, S-9 mix 그리고 2-AF를 미리 5, 10, 20,

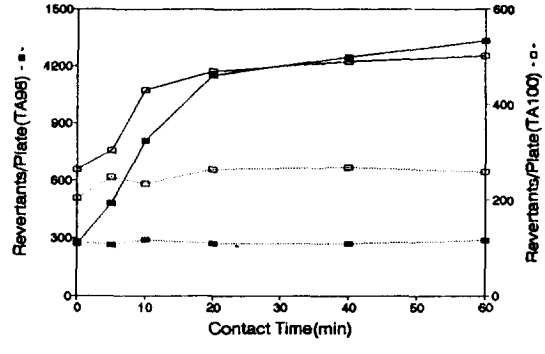

Fig. 1. The effect of contact time of cell and 2-AF on the antimutagenicity.
2-AF control: 2160 revertants/plate for TA98, 520 revetants/plate for TA100 spontaneous revertants: 23/Plate for TA98, 130/Plate for TA100, solid line: sample addition after reaction of cell and 2-AF, broken line: reaction of cell and 2-AF in the presense of sample.

40, 60분간 반응시킨 다음 미나리즙을 첨가하면 변이원 억제효과는 점점 감소하여 복귀 돌연변이수가 plate당 각각 480, 805, 1151, 1239, 1332로 균체와 2-AF의 접촉시간에 따라 증가하였다. 이와 같은 경향은 TA100에서도 유사하였다.

한편 TA98 균주, 2-AF, S-9 mix 및 들미나리즙이 공존하는 상태에서는 반응시간을 달리하여도 복귀 돌연변이수는 263~289/plate로 일정한 수준이었다.

즉 들미나리즙의 존재하에서는 균체에 2-AF와 S-9 mix를 반응시켜도 시간에 따른 복귀돌연변이의 증가가 나타나지 않았다.

균체와 2-AF 및 S-9 mix 반응액에 대한 들미나리즙의 작용시간에 따른 변화

복귀변이가 일어난 균체에 미치는 미나리즙의 영향을 알아보기 위하여 먼저 균체에 2-AF와 S-9 mix를 첨가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 다음, 여기에 들미나리즙을 가하고 37℃의 진탕 혼합기 내에서 0, 10, 20, 40, 60분간 반응시킨 반응액의 복귀돌연변이수를 측정한 결과 Table 4와 같다.

표에서 보는 바와 같이 들미나리즙을 첨가한 다음 반응시간을 달리하여도 복귀변이수는 957~1079/plate로 거의 일정한 수준이었다.

이러한 결과로 보아 2-AF와 S-9 mix에 의하여 일단 변이가 일어난 균체는 들미나리 생즙을 가하여 반응시켜도 변이자체를 수복시키지는 못함을 알 수 있었다.

가열들미나리즙의 변이원성 억제효과

들미나리즙을 100℃에서 20분간 가열처리한 다음 2-AF에 의해 유도된 변이원성에 대한 시료의 억제효과를 측정한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 열처리한 들미나리즙과 신선한 들미나리즙 사이에는 돌연변이 억제효과에 차이가 거의 없었다. 이와 같은 결과는 참취 등 10종의 가열즙에 대하여 돌연변이 억제작용을 보고한 함[16]의 연구와 비슷한 결과를 나타내었다.

시료첨가전 2-AF와 S-9 mix의 반응시간의 영향

2-AF는 S-9 효소계에 의해서 활성화 되어야만 변이원성을 나타낸다. 따라서 2-AF와 S-9 mix를 먼저 일정시간 반응시킨 다음 균과 시료 50 μl 및 완충액을 첨가하여 20분간 preincubation시켜 plate에 접종하였다. 이때 2-AF, S-9 mix의 사전 반응 시간에 따른 TA98의 coloney 수는 Fig. 2와 같다.

Table 4. The effect of the preincubation time after sample addition on the microbial mutagenicity in *S. typhimurium* TA98

Preincubation time (min)	Revertants/plate
0	1,008
10	1,002
20	1,025
40	957
60	1,079
2-AF control	1,384
Spontaneous	17

Table 5. The comparison of antimutagenic effects of fresh juice and heated juice on the mutagenicity induced by 2-AF in *S. typhimurium* TA98

Sample volume (ul/plate)	Revertants/plate	
	Fresh juice	Heated juice
50	715	890
100	262	298
200	161	165
300	92	96
2-AF control	1,874	
Spontaneous	23	

2-AF, S-9 mix, 균 및 시료 50 μl를 동시에 첨가하여 실험한 경우 복귀 돌연변이 집락수가 165수준이었으나 2-AF와 S-9 mix를 사전에 10, 20, 40 60분 반응시킨 다음 시료 50 μl를 첨가하여 실험한 경우 집락수는 각각 402, 467, 552 및 690/plate로 증가하였다. 즉 동일한 양의 미나리즙을 첨가하여도 2-AF와 S-9 mix의 사전 반응시간이 길어질수록 변이원 억제활성은 감소되는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과로 보아 2-AF와 S-9 mix를 일정시간 반응시키면 이때 2-AF는 대사를 받아 변이원성을 나타내게 되고 시료를 첨가하면 S-9 mix의 효소활성이 중지 혹은 약화되어 변이원성이 현저히

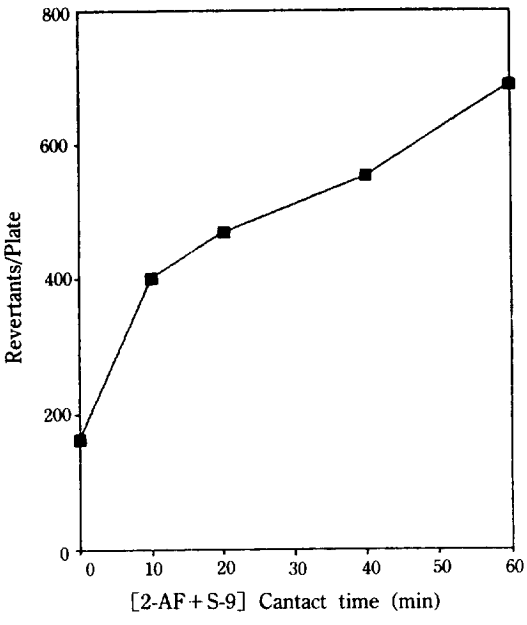

Fig. 2. The effect of contact time of 2-AF and S-9 mix before addition of sample juice.

감소하며 이와 같은 결과가 변이원 억제효과로 나타남을 알 수 있었다.

고 찰

항돌연변이원성을 나타내는 작용기작은 첫째, 유전학적 수준에서의 발현억제,[17] 항돌연변이 활성을 갖는 유전자의 관여, 혹은 error-prone repair[18] 등으로 설명되고 있으며, 둘째, promutagen을 mutagen으로 변화시키는 활성을 억제하거나 변이원성을 갖는 electrophile과 결합하여 이들의 변이원 활성을 실활 시키다든가 또는 이와 같은 반응에 관여하는 효소의 작용,[19] 셋째, 변이원성 물질을 흡착 혹은 이들과 결합하여 세포막 투과성이나 세포내 target sites에 도달하는 이동성을 감소시킴으로서 변이원성을 억제하는 mechanism도 제안되고 있다.[20]

먼저 유전자 수준의 수복에 의한 변이원 억제효과의 가능성을 확인하기 위하여 균체, 2-AF와 S-9 mix를 일정시간 반응시켜 돌연변이를 일으킨 다음 여기에 시간을 달리하면서 들미나리즙을 작용시켜 본 결과 작용시간을 연장하여도 변이원 억제효과에는 전혀 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 보아 이미 돌연변이를 일으킨 균체는 들미나리즙을 첨가하여도 유전자 수복계(gene repair system)가 가동된다든가 혹은 여기에 관여하는 효소 활성의 증가 등은 나타나지 않음을 시사한다.

Preincubation 과정에서 복귀돌연변이 균체수는 2-AF와 균체의 접촉시간에 대하여 대수적으로 증가하였으며 들미나리즙을 첨가하면 복귀돌연변이가 거의 일어나지 않았다.

한천배지 내에서 생육저지대의 크기를 관찰한 실험결과로 보아 미나리즙의 첨가량을 증가시킬수록 crystal violet의 확산능이 감소하는 것으로 나타났으나 추후 다른 실험방법을 통한 면밀한 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

들미나리즙내 어떤 물질이 2-AF와 결합하여 변이원성을 감소시킨다면 2-AF와 미나리즙의 작용시간에 따라 변이원성은 감소할 것이다. 그러나 본 실험결과에서 이와 같은 증거는 나타나지 않았다.

2-AF와 S-9 mix를 시간을 달리하면서 사전에 반응시킨 다음 시료를 첨가하면 2-AF와 S-9 mix의 반응시간이 길수록 돌연변이원성이 강하게 나타났다. 즉 시료를 첨가한 다음에는 변이원성이 현저히 감소함을 알 수 있었는데 이는 들미나리즙 안에 S-9 mix의 효소 활성을 저해시키는 물질이 존재함을 의미한다. 2-AF는 S-9 mix의 효소 활성에 의해서 ultimate mutagen으로 변환되어야 변이원성을 나타내는데 들미나리즙을 첨가하면 이와 같은 변환이 일어나지 못하여 변이원성을 나타내지 못하는 것이라 판단된다. 아울러 들미나리즙 중에 존재하는 S-9 mix 효소활성 저해물질은 열에 매우 안정한 화합물질임을 알 수 있었다.

국문요약

본 연구는 Ames방법에 의한 들미나리즙의 항돌연변이 효과에 대하여 돌연변이 억제효과를 나타내는 작용기작을 검토하기 위하여 실시하였다. 실험결과 시료즙이 변이원 물질인 2-AF와 결합하여 변이원 활성을 억제하거나 시료즙의 어떤 성분이 돌연변이 관련 유전자에 작용하여 항돌연변이원성을 나타낸다는 증거는 발견할 수 없었다. 그러나 2-AF와 S-9 mix를 일정시간 반응시킨 후 시료즙을 첨가할 경우 2-AF와 S-9 mix의 반응시간이 길수록 더 강한 변이원성을 나타내었으며 시료즙의 첨가 후에는 2-AF의 변이원성이 억제되었다. 즉, 들미나리즙의 항돌연변이 효과는 시료즙내의 어떤 성분이 S-9 mix에 존재하는 효소의 저해제로 작용하여 2-AF가 ultimate mutagen으로 전환되는 것을 차단하므로서 나타나는 효과인 것으로 판단 되었다.

참고문헌

1. Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**, 1256-1264 (1983).
2. Kada, T., Morita, K. and Inoue, T.: antimutagenic action of vegetable factor on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.*, **53**, 351-353 (1978).
3. Morita, K., Hara, M. and Kada, T.: Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from animal acids. *Agri. Biol. Chem.*, **42**, 1235-1238 (1978).
4. Scott, B.R., Sparrow, A.H., Schwemmer, S.S. and Schairer, L.A.: Plant metabolic activation of 1,2-dibromoethane(EDB) to a mutagen or great potency. *Mutat. Res.*, **49**, 203-212 (1978).
5. Benigni, R., Begnami, M., Camoni, I., Carere, A., Conti, G., Iachetta, R., Morpurgo, G. and Ortali, V.A.: A new *in vitro* method for testing plant metabolism in mutagenicity studies. *J. Toxicol. Environ. Health*, **5**, 809-819 (1979).
6. Yano, K.: Effect of vegetable juices and milk on alkylating activity of N-methyl-N-nitrosourea. *Agric. Food Chem*, **27**, 456-458 (1979).
7. Schinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z.L. and Hosoda, H.: Antimutagenicity of dialysates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1369 (1988).
8. Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, J. and Brockman, H.E.: Chlorophyllin, a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.*, **173**, 111-115 (1986).
9. 함승시: 재래종 황색 자두 효소 갈변반응 생성물의 돌연변이 억제작용. 한국 농화학회지, **30**, 71 (1987).
10. 백창원, 함승시: 사과 Polyphenol oxidase에 의한 효소적 갈변반응 생성물의 항 돌연변이 효과. 한국 식품과학회지, **22**, 625-631 (1990).
11. 이경임, 박건영, 이숙희: 아플라톡신 B_1과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이 효과. 한국 영양식품학회지, **21**, 143-148 (1992).
12. 한규석, 함승시, 정의호, 이해금: Trp-P-1과 2-AF에 대한 산채류 생즙의 항돌연변이 효과. 식품 위생학회지, **7**, 161-168 (1992).
13. Matsushima, T., Sungimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial test. *In Short-term test system for detecting carcinogens* (K. H. Norpoth and R.C. Cancer Eds), Springer, Berlin, 273-285 (1980).
14. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashmoto, Y.: Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Letter*, **1**, 91-96 (1975).
15. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.: Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella. *Mutation Res.*, **48**, 121-130 (1977).
16. 함승시: 산채류 가열즙의 돌연변이 억제작용에 관한 연구. 한국 농화학회지, **31**(1), 38-45 (1988).
17. Clarke, C.H. and Shankel, D.M.: Antimutagenesis in microbial system. *Bacteriol. Rev.*, **39**, 33-53.
18. Burckhardt, S.E., Woodgate, R., Scheuermann, R. H. and Echols, H.: UmuD mutagenesis protein of *E. coli*: Overproduction, purification and cleavage by Rec A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 1811-1815 (1988).
19. Lam, L.K.T., Sparnins, V.L. and Wattenberg, L.W.: Effects of derivatives of kahweol and cafestol on the activity of glutathione-S-transferase in mice. *J. Med. Chem.*, **30**, 1339-1403 (1970).
20. Sato, T., Ose, Y., Nagase, H. and Hayase, K.: Mechanism of the desmutagenic effect of humic acid. *Mutation Res.*, **176**, 199-204 (1987).