

山菜類 加熱汁의 돌연변이 억제 작용에 관한 研究

함 승 시

강원대학교 식품공학과

Desmutagenic Activity of Heated Mountain Herb Juices

Seung-Shi Ham

Department of Food Science and Technology, Kangweon National University, Chuncheon, Korea

Abstract

Potential mutagenicity of ten heated edible mountain herbs were examined with spore rec-assay, Ames test and DNA breaking test. Samples of edible mountain herbs were prepared with water extraction at 100°C for 20 minutes. With the rec-assay, no significant mutagenic activity could be obtained from all of the samples, but among the eight of metal ions added to sample solution, Pb^{2+} to *R. crispus* heated juice, Zn^{2+} to *L. fischeri* and *S. bracycarpa* heated juice increased mutagenic activity of the samples. With the Ames test and DNA breaking test, all of the samples did not show mutagenicity. However, breaking action was activated on heated *L. fischeri*, *P. japonicus*, *A. triphylla* and *A. tataricus* juices in the presence of 25mM Cu^{2+} . But heated *A. elata*, *H. aurantiaca*, *A. triphylla*, *S. bracycarpa* and *A. scaber* juices were inactivated in the presence of 25mM Fe^{2+} . Desmutagenic activities against benzo(α)pyrene significantly increased as increasing concentration of the heated edible mountain herb juices.

緒 論

현재 우리나라 山地에서 生産되고 있는 各種 山菜類의 年間 生産量은 막대한 量에 이르고 있으나 이러한 食品資源들의 生理作用에 對한 研究은 전혀 이루어진바 없다. 즉 이들 食品資源들의 安全性에 關한 科學的인 證據도없이 옛부터 傳統的으로 食用되어 왔다.

最近에 들어와서 發癌성과 關聯하여 加工食品을 비롯한 天然食品의 安全性에 關해서도 많은 관심을 가지게 되었다.¹⁻²⁾ 長尾³⁾는 日常食品中的 突然變異原物質에 對하여 研究한바 있으며 Kada⁴⁾나 Lai⁵⁾ 등은 日常 食用野菜中的 抗突然變異原성에 對하여 研究하여 野菜의 生汁이 抗突然變異原성이

있음을 報告 하였다.

食品成分의 發癌性 및 突然變異 誘起性에 關해서는 Sugimura⁶⁾ 등에 의해 많은 研究가 行해지고 있으며 食品의 加工, 調理에 의해 生成된 物質中에는 發癌性 뿐만 아니라 抗癌性 効果도 가지고 있음을 밝혔다. 특히 發癌性은 食品添加物을 비롯하여 고사리의 alkaloi 成分에 의한 것이 대표적이며, 抗癌性은 野菜의 抽出物이나 lignin 成分이 Endo⁷⁾ 등에 의해 報告 되었다.

한편 食品加工中에 生成된 化合物에 의한 發癌性은 食肉加工食品中的 添加物에 의하여 生成되는 nitrosamine과 tryptophane의 pyrolysis에 의하여 生成되는 Trp-p-1, Trp-p-2 등이 Kosuge⁸⁾ 등에 의해 報告되었다. 그외에도 核酸關聯化合物이 褐變反應에 關하여 生成된 核酸構成 成分의 誘導體에 對한 突然變異性 및 DNA 切斷作用도 研究되었으며⁹⁾ amino-carbonyl 反應生成物의 突然變異原성에 關해서는 Nomura¹⁰⁾ 등에 의해 報告되었음.

1988년 1월 8일 수리

本 研究은 1987年度 太平洋獎學文化財團의 學術研究助成費에 의해 研究되었음.

다.

本實驗에서는 우리나라 山地에서 一般적으로 採取되고 있는 山菜類 가운데서 10種類를 選定하여 이들의 加熱汁에 대하여 變異原性 實驗을 實施하여 變異原性 有無를 確認하고 最終적으로 變異原 抑制效果를 檢討하여 이들 山菜類의 生理作用을 料明하였다.

材料 및 方法

材 料

本 實驗에 使用한 山菜類는 旌善郡의 山地에서 直接 購入하여 精選한 다음 물로 잘 洗滌하여 表面에 물기가 없도록 乾燥하여 實驗에 使用하였으며 그 種類는 릿미나리(*Hemerocallis aurantiaca*), 참취(*Aster scaber*), 소리쟁이(*Rumex crispus*), 잔대(*Adenophora triphylla*), 참나물(*Spuriopimpinella bracycarpa*), 머위(*Petasites japonicus*) 곱취(*Ligularia fischeri*), 원추리(*Ostericum sieboldii*), 개미취(*Aster tataricus*) 및 두릅(*Aralia elata*)이었다.

山菜類 加熱汁의 調製

生産地로부터 購入한 山菜類를 各各 1kg씩 取하여 마쇄기로 마쇄하여 搾汁한 다음 즉시 100°C로 20分間 加熱處理하여 酵素作用을 抑制함과 동시에 蛋白質을 凝固시켰다. 이 加熱汁液을 5000rpm에서 3分間 遠心分離하여 最終적으로 搾汁의 量을 計算한 후 milipore filter(0.45 μ m)로 濾過하여 實驗에 使用하였다.

Spore rec-assay

胞子の 調製는 Kada 等의 方法¹¹⁻¹³에 準하여 *Bacillus subtilis* H17(Rec⁺) 및 M45(rec⁻) 두 菌株의 胞子를 調製하였으며 胞子寒天 plate의 調製는 前報¹⁴에 準하여 實驗하였다. 같은 培地를 2本 調製하여 50°C로 冷却시켜 1/當 10ml의 *Bacillus subtilis* H17 및 M45 胞子懸液을 各各 加하여 잘 混合한 후 petri dish內에 10ml씩 分注하였다. H17 및 M45 胞子寒天培地를 各各 固化시킨 培地 위에 直徑 8mm, 두께 1.2mm의 paper disc를 올려놓고 試料溶液을 50 μ l씩 各各 加하여 37°C에서 20時間 培養한 후 paper disc 주위에 生成된 生育 阻止帶의 直徑을 測定하여 H17 및 M45 두 菌株

의 阻止帶 直徑差로서 變異原性의 強度를 判定하였다. 한편 이들 試料溶液에 依한 *Bacillus subtilis* 두 菌株의 DNA 修復에 있어서 金屬이온의 影響을 알아보기 위해서 25mM의 Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ 및 Mn²⁺ 溶液을 各各 10 μ l씩 添加하였다. 陽性 對照로는 4-nitroquinoline-1-oxide[4-NQO]를 使用하였다.

DNA 切斷實驗

Thomas 等¹⁵의 方法에 依해 實驗하였으며 calf thymus DNA를 25mM NaH₂PO₄-12.5mM Na₂HPO₄ 緩衝溶液(pH 6.6)에 溶解하여 各 試料 20 μ l와 DNA 溶液(0.5mg/ml) 20 μ l의 混合液을 만들었다. 金屬이온의 影響을 알아보기 爲해서는 위 試料溶液에 8種類의 25mM 金屬이온 溶液을 各各 10 μ l씩 加하여 混合液을 만들었으며 對照로서는 20 μ l의 dimethylsulfoxide와 20 μ l의 DNA 溶液 및 10 μ l의 蒸溜水를 使用하였다. 이들 各 反應混合物 50 μ l를 37°C로 3時間 反應시키면서 每時間마다 反應液을 取하여 10 μ l의 0.3% bromophenol blue 溶液과 함께 0.8%의 agarose를 1.0mM EDTA, 18mM의 NaCl 溶液 및 0.4mg/ml의 ethidium bromide를 含有하는 tris-acetate 緩衝溶液(pH 6.8)에 溶解하여 製作한 slab gel 上에 loading 하여 電氣脈動分析 하였다.

電氣脈動上에 나타나는 各 試料의 spot 流動性을 電氣脈動 分析하였다. 電流는 20mV, 電壓 20mA로 調整하여 20時間 電氣脈動을 行하여 中間體와 結合된 DNA ethidium bromide 混合物를 長波長의 UV lamp 照射下에서 red filter를 使用하여 撮影하였다.

突然變異原性 및 突然變異 抑制作用

Ames의 plate法¹⁶을 改良한 preincubation法¹⁷에 依해 實驗하였으며 S-9 mix의 調製는 Maron 等¹⁸의 方法에 따라 調製하였다. 誘導物質로서는 phenobarbital과 5,6-benzoflavone을 使用하였다.

突然變異原의 抑制作用을 알아보기 爲해 使用한 變異原物質로서는 benzo(α)pyrene(μ g/ μ l)을 使用하였다. 變異原物質의 添加量은 10 μ g로 一定하게 固定하였으며 試料溶液의 濃度를 50 μ l에서 最高 200 μ l까지 添加 하였다. S-9 mix의 添加量은 300 μ l로 하였다.

結果 및 考察

Spore rec-assay 結果

表 1은 山菜類 加熱汁에 對한 突然變異原性有無를 糾明하기 위하여 枯草菌을 利用한 孢子 rec-assay를 行한 結果로서 10種類의 加熱汁 모두 枯草菌 DNA에 對한 損傷能力은 없는 것으로 나타났다. 따라서 加熱汁 모두 變異原性은 없는 것으로 確認되었다.

表 2는 10종류의 山菜類加熱汁의 枯草菌 DNA 損傷作用에 8가지 金屬이온의 影響을 調査한 結果로서 芫荽나리 加熱汁의 경우 Zn^{2+} 을 添加하였을 때 弱한 變異原性을 나타내었으며 참취의 경우는 金屬이온의 影響을 받지 않았다. 소리쟁이 加熱汁에서는 Pb^{2+} 添加時 DNA 損傷에 強한 影響을 미치는 것으로 나타났. 잔대 加熱汁에서는 Mn^{2+} 에서 弱한 DNA 損傷을 보였으며 Pb^{2+} 과 Zn^{2+} 添加時 強한 變異原性을 나타내었다. 참나물과 곰취의 加熱汁에서는 Zn^{2+} 添加時에 強한 變異原性을 보였으며 머위 加熱汁의 경우는 Pb^{2+} 과 Zn^{2+} 添加에

Table 1. Spore rec-assay on heated edible mountain herb juices

Sample	Dose mg/plate	Inhibition zone(mm)		Difference	Conclusion
		Rec ⁺	Rec ⁻		
<i>R. crispus</i>	159	0	0	0	—
<i>O. sieboldii</i>	85	0	0	0	—
<i>L. fischeri</i>	125	0	0	0	—
<i>A. tataricus</i>	327	0	0	0	—
<i>A. scaber</i>	133	0	0	0	—
<i>H. aurantiaca</i>	120	0	0	0	—
<i>A. elata</i>	142	0	0	0	—
<i>S. bracycarpa</i>	130	0	0	0	—
<i>P. japonicus</i>	70	0	0	0	—
<i>A. triphylla</i>	171	0	0	0	—

— : no inhibition, ± : length of inhibition zone is less than 5mm, + : 5~10mm of inhibition zone, ++ : more than 10mm of inhibition zone, +++ : more than 20mm of inhibition zone.

Table 2. Effect of various metal ions on the spore rec-assay of heated edible mountain herb juices

Metal ions	Heated juice*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
None	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cu^{2+}	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—
Fe^{2+}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fe^{3+}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pb^{2+}	—	—	+	+	—	±	—	—	—	—
Mn^{2+}	—	—	—	±	—	—	—	—	±	—
Zn^{2+}	±	—	—	++	+	±	+	—	—	—
Ni^{2+}	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—
Al^{3+}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* 1. *H. aurantiaca* 2. *A. scaber* 3. *R. crispus* 4. *A. triphylla* 5. *S. bracycarpa* 6. *P. japonicus* 7. *L. fischeri* 8. *O. sieboldii* 9. *A. tataricus* 10. *A. elata*

Dose of heated juice is 50μl/plate

서 弱한 變異原性を 나타내었다. 개미취加熱汁은 Cu^{2+} , Mn^{2+} 및 Ni^{2+} 이 각각 存在할 경우 枯草菌 DNA 損傷에 弱한 影響을 나타내었다. 그의 원추리와 두릅加熱汁의 경우는 金屬이온의 影響을 받지 않는 것으로 認定되었다.

DNA 切斷作用

10種類의 山菜類加熱汁의 calf thymus DNA에 대한 切斷能力을 檢討한 결과(그림 1) 加熱汁과의 反應時間을 3時間까지 반응시켰을 경우 試料 모두 DNA 切斷能力은 없는 것으로 認定되었다. 그러나 8가지 金屬이온의 影響에 있어서는 靑취, 머위 잔대, 개미취가열즙의 경우는 25mM Cu^{2+} 공존시 강한 절단작용이 인정되었으나 두릅, 원추리, 잔대, 참나물 그리고 참취가열즙은 Fe^{2+} 공존시 DNA 절단을 억제하였다. 이와같은 결과는 菜蔬液汁이 갖는 DNA 切斷物質 중에는 Cu^{2+} 공존에 의해 그 活性이 저하하는 型과 상승하는 型이 있다는 大村¹⁹⁾의 研究報告와 비슷한 결과를 얻었다.

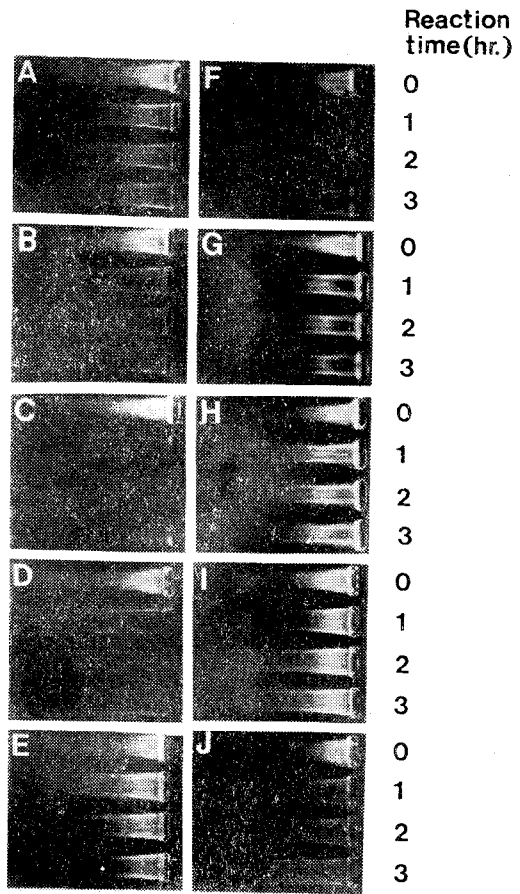


Fig. 1. Time course of the DNA-breaking action of edible mountain herb juices

A : *Adenophora triphylla* B : *Aralia elata*
 C : *Aster scaber* D : *Aster tataricus* E :
Hemerocallis aurantiaca F : *Ligularia fischeri*
 G : *Ostericum sieboldii* H : *Petasites japonicus*
 I : *Rumex crispus* J : *Spuriopimpinella bracycarpa*

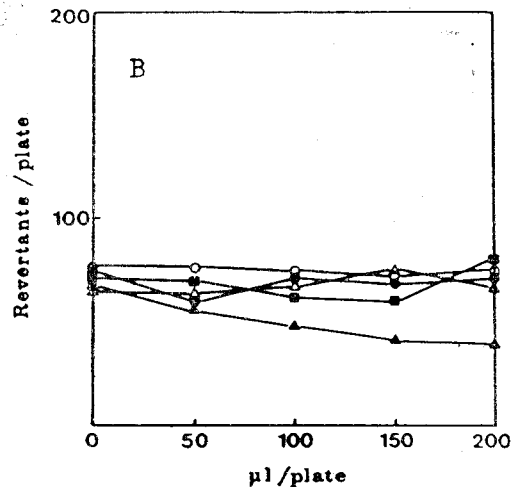
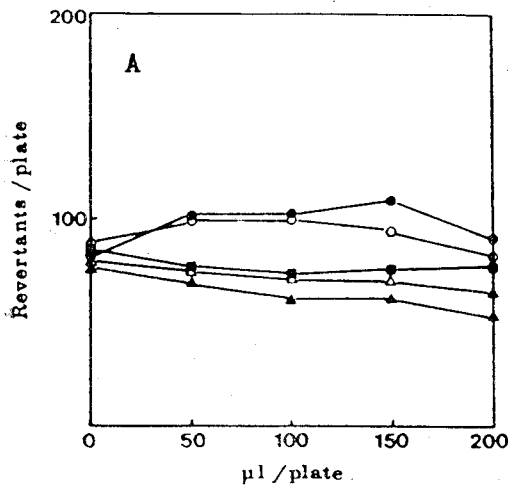


Fig. 2. Mutagenicity of the heated edible mountain herb juices on *Salmonella typhimurium* TA98 with S-9mix

A : (—△—) : *Adenophora triphylla*, (—■—) : *Ligularia fischeri*, (—▲—) : *Ostericum sieboldii*, (—○—) : *Petasites japonicus*, (—●—) : *Rumex crispus*.
 B : (—○—) : *Hemerocallis aurantiaca*, (—●—) : *Aster tataricus*, (—△—) : *Aster scaber*, (—▲—) : *Aralia elata*, (—■—) : *Spuriopimpinella bracycarpa*.

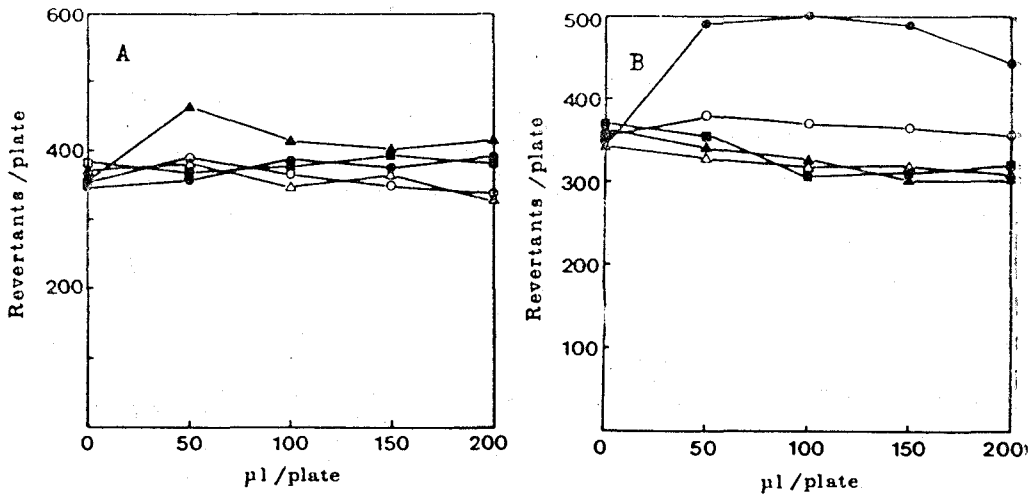


Fig. 3. Mutagenicity of the heated edible mountain herb juices on *Salmonella typhimurium* TA100 with S-9mix

- A : (—▲—) : *Aralia elata*, (—●—) : *Hemerocallis aurantiaca*, (—△—) : *Aster scaber*,
 (—○—) : *Aster tataricus*, (—■—) : *Spuriopimpinella bracycarpa*.
 B : (—●—) : *Rumex crispus*, (—○—) : *Petasites japonicus*, (—■—) : *Ligularia fischeri*,
 (—△—) : *Adenophora triphylla*, (—▲—) : *Ostericum sieboldii*.

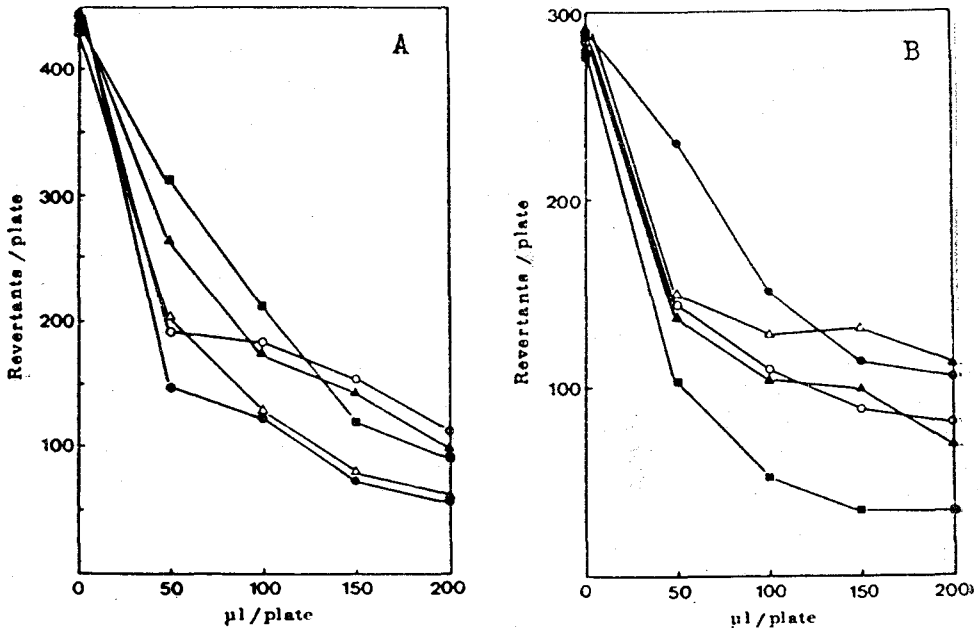


Fig. 4. Desmutagenicity of the heated edible mountain herb juices on *Salmonella typhimurium* TA98 with S-9 mix

- A : (—○—) : *Petasites japonicus*, (—▲—) : *Ligularia fischeri*, (—■—) : *Rumex crispus*,
 (—△—) : *Ostericum sieboldii*, (—●—) : *Spuriopimpinella bracycarpa*.
 B : (—△—) : *Adenophora triphylla*, (—○—) : *Aralia elata*, (—▲—) : *Aster tataricus*,
 (—■—) : *Aster scaber*, (—●—) : *Hemerocallis aurantiaca*.

突然變異原性

山菜類의 加熱汁에 의한 生理作用을 檢討하는 것은 安全性面에서 대단히 중요하며 최종적으로 이들 산채류 가열즙의 항돌연변이원성도 검토하는 것은 산채류의 개발에 크게 도움이 될 것이다. 그림 2는 S-9 mix를 첨가하였을 경우의 *Salmonella typhimurium* TA98株에 대한 山菜類加熱汁의 突然變異 誘起作用을 나타낸 것으로서 加熱汁의 濃度 增加에도 變異原性은 없는 것으로 나타났다. 한편 그림 3에서와 같이 TA100株의 경우에도 TA98株와 같이 10種類의 試料 모두 變異原性은 없었다.

突然變異 抑制作用

山菜類加熱汁에 對한 突然變異原性 實驗結果 供試된 試料모두 變異原性은 없는 것으로 認定되었다. 따라서 이들 山菜類加熱汁에 依한 抗突然變異原性을 檢討하기 위하여 變異原物質인 benzo[α]

pyrene을 使用하여 變異原 活性抑制 效果를 檢討한 결과 10種類의 山菜類 加熱汁은 그림 4에서와 같이 加熱汁의 添加量 增加에 따라 TA98株에 대하여 變異原 活性을 强하게 抑制하였다. TA100株에 對해서도 程度의 差異는 있으나 그림 5와 같이 强한 變異原活性 抑制效果를 나타냈다. 表 3에 나타난 바와같이 變異原 活性抑制度는 TA98株에 對하여 試料 50 μ l를 添加하였을 때 참나물이 63.6%로서 가장 强하고 그의 머위, 원추리, 개미취, 두릅, 잔대, 곰취, 소리쟁이 및 뽕미나리 순으로 變異原 活性 抑制效果를 나타냈다. 200 μ l 添加에서는 참취(87.5%), 참나물(86.9%) 및 원추리(86.2%) 등이 强한 抑制效果를 나타냈으며 그의 소리쟁이, 곰취, 머위, 개미취, 두릅, 잔대 및 뽕미나리 순으로 나타났다.

한편 TA100株에서는 50 μ l 添加하였을 경우 잔대(70.1%), 개미취(61.3%) 및 참취(59.8%)의 加熱汁에서 다소 强한 抑制效果를 나타내었으며 200 μ l 添加에서는 두릅(79.7%), 개미취(76.8%),

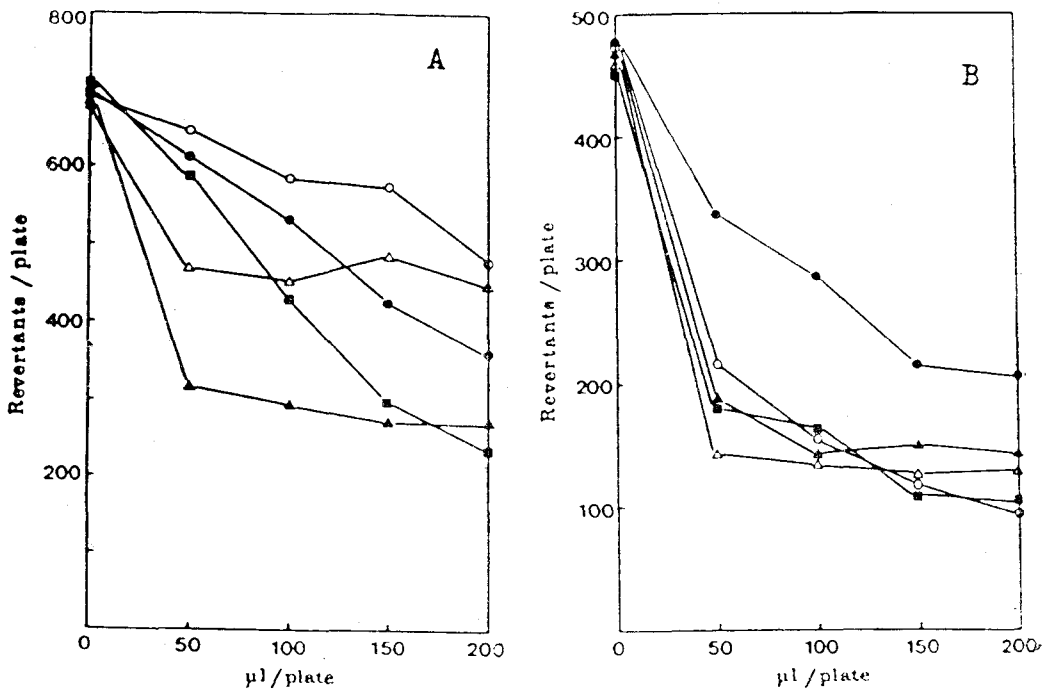


Fig. 5. Desmutagenicity of the heated edible mountain herb juices on *Salmonella typhimurium* TA 100 with S-9 mix

- A : (—○—) : *Petasites japonicus*, (—△—) : *Ostericum sieboldii*, (—●—) : *Rumex crispus*,
 (—▲—) : *Ligularia fischeri*, (—■—) : *Spuriopimpinella bracycarpa*.
 B : (—▲—) : *Aster scaber*, (—△—) : *Adenophora triphylla*, (—■—) : *Aster tataricus*,
 (—○—) : *Aralia elata*, (—●—) : *Hemerocallis aurantiaca*.

Table 3. Desmutagenicity of the heated edible mountain herb juices on *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA100 with S-9 mix

Test compounds	Dose (μ l)	Inhibition(%)		Test compounds	Dose (μ l)	Inhibition(%)	
		TA 98	TA 100			TA 98	TA 100
<i>Petasites japonicus</i>	50	57.8	9.7	<i>Adenophora triphylla</i>	50	46.4	70.1
	100	59.8	17.1		100	52.5	72.3
	150	64.4	19.0		150	51.1	72.8
	200	72.7	32.1		200	59.6	72.3
<i>Ligularia fischeri</i>	50	40.0	55.0	<i>Aralia elata</i>	50	46.8	53.6
	100	61.2	57.1		100	59.3	67.4
	150	66.7	65.0		150	65.7	73.1
	200	77.8	65.0		200	67.5	79.7
<i>Rumex crispus</i>	50	28.9	13.9	<i>Aster tataricus</i>	50	51.8	61.3
	100	51.6	26.0		100	61.4	63.2
	150	73.1	40.0		150	64.2	76.8
	200	78.2	47.9		200	72.2	76.8
<i>Ostericum sieboldii</i>	50	55.6	33.6	<i>Aster scaber</i>	50	63.6	59.8
	100	72.3	35.7		100	79.6	71.3
	150	82.0	47.7		150	87.5	69.1
	200	86.2	50.3		200	87.5	70.2
<i>Spuriopimpinella bracycarpa</i>	50	67.1	16.4	<i>Hemerocallis aurantiaca</i>	50	17.9	27.7
	100	71.8	39.3		100	45.3	39.4
	150	84.0	55.7		150	58.2	54.3
	200	86.9	64.3		200	61.8	55.3

잔대(72.3%) 및 참취가열즙(70.2%)에서 강한 變異原活性 抑制效果를 나타내었다. 그의 곰취, 참취, 뫄미나리 및 원추리가열즙도 對照區보다 50% 이상의 變異原活性抑制效果를 나타내었다. 이를 山菜類加熱汁의 變異原活性抑制效果를 TA98株와 TA100株에 關해서 비교하면 TA98株에서는 머위, 소리쟁이, 원추리, 참나물 및 참취加熱汁이, TA 100株에 對해서는 곰취, 잔대, 두릅, 개미취 및 뫄미나리加熱汁이 強하게 抑制하는 것으로 認定되었다.

초 록

10種類의 山菜類加熱汁에 대한 突然變異原性を Spore rec-assay, Ames test 그리고 DNA 切斷實驗으로 檢討하였으며 加熱汁의 調製는 100°C에서 20분간 가열하여 加熱汁을 얻었다. Spore rec-assay

결과 10種類의 試料모두 變異原성은 없었으며 금속이온의 영향에서 소리쟁이가열즙은 Pb^{2+} , 곰취와 참나물가열즙의 경우는 Zn^{2+} 의 존재하에서 변이원성을 나타내었다. Ames 시험과 DNA 절단시험에서도 시료모두 변이원성은 없었으며 DNA 切斷시험에서는 곰취, 머위, 잔대, 개미취가열즙의 경우는 25mM Cu^{2+} 공존하에서 切斷活性이 촉진되었다. 그러나 두릅, 원추리, 잔대, 참나물 그리고 참취加熱汁은 Fe^{2+} 의 공존시 DNA 切斷活性을 抑制시키는 結果를 얻었다. Benzo[α]pyrene에 대한 突然變異 抑制作用에서는 試料 모두 濃度增加에 따라 強한 變異原 抑制作用을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Yoshida, D., Nishigawa, H. and Matsumoto, T.: Agric. Biol. Chem., 43: 1769(1979)

2. Yoshida, D. and Matsumoto, T.: Agric. Biol. Chem., 43 : 1155(1979)
3. 長尾美奈子 : 變異原と毒性, 4(4) : 20(1981)
4. Kada, T., Morita, K. and Inoue, T.: Mutation Res., 53 : 351(1978)
5. Lai, C.N., Butler, M.N. and Matney, T.S.: Mutation Res., 77 : 245(1980)
6. Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitake, Y. and Itai, A.: Proc. Japan Acad., 53 : 58(1977)
7. Endo, E.: Mutagens and Toxic(Japan), 4 : 27 (1978)
8. Kosuge, K., Tsuji, K. and Wakabayashi, T.: Chem. Pharm. Bull., 26 : 611(1978)
9. Lee, J.H.: Korean Biochem., J., 16(3) : 240 (1983)
10. Nomura, D. and Omura, H.: Chemistry of Reductone, Uchida, Pokakuho Publishing Co., Ltd, Tokyo(1969)
11. Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y.: Mutation Res., 53 : 351(1978)
12. Kada, T., Hirano, K., Hagiwara, T., Ohta, Y. and Matsumoto, H.: Mutation Res., 97 : 339(1982)
13. Kada, T., Hirano, K. and Shirasu, Y.: Chemical Mutagens, 6, N.Y., Plenum Press, (1980)
14. Ham, S.S., Park, B.K., Lee, S.Y., Lee, J.H., Kang, C.K., Lee, D.S. and Omura, H.: J. Korean Agric. Chem. Soc., 27 : 264 (1984)
15. Thomas, M. and Davis, R.: J. Mol. Biol., 91 : 315(1975)
16. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Mutation Res., 31 : 347(1975)
17. 矢作多貴江 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 20 : 1178 (1975)
18. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Res., 113 : 173(1983)
19. 大村浩久 : 昭和 56, 57, 58年度 科學研究費補助金(一般研究 B) 研究成果報告(1984)