

Salmonella assay system에서 고추가루에 의한 Aflatoxin B₁의 돌연변이유발 저해효과

김소희* · 박건영† · 서명자

부산대학교 식품영양학과
*동주여자 전문대학 식품영양과

Inhibitory Effect of Aflatoxin B₁ Mediated Mutagenicity by Red Pepper Powder in the Salmonella Assay System.

So-Hee Kim*, Kun-Young Park† and Myung-Ja Suh

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

*Dept. of Food and Nutrition, Dong Ju Women's Junior College, Pusan 604-080, Korea

Abstract

The mutagenic, comutagenic and antimutagenic effects of red pepper powder were studied by using Ames mutagenicity test. Extracts(3 fractions) of the red pepper powder did not show any mutagenicity with or without S9 mix in *Salmonella typhimurium* strains of TA100 and TA98. These extracts did not show any comutagenicity on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG). Capsaicin also did not exhibit any mutagenicity in the absence or presence of S9 mix prepared from rat or hamster livers. However, the red pepper powder extracts showed antimutagenicity against aflatoxin B₁(AFB₁) mediated mutagenicity. Especially first fraction of the pepper powder inhibited strongly the mutagenicity of AFB₁. There was no difference on these activities between hotter tasted pepper powder and plain hot tasted pepper powder.

Key words : red pepper powder, mutagenicity, antimutagenicity, aflatoxin B₁

서 론

고추는 가지과에 속하는 1년생 채소로서 향신, 조미료로서 뿐 아니라 방부, 색상의 효과 등으로 인하여 한국인의 식생활에서 빼놓을 수 없는 중요한 역할을 하고 있는 식품이다.

그러나 우리나라 사람들의 식습관에서 고추와 같

은 매운 음식이 건강에 좋지 않으리라는 의문은 계속되어왔다. 앞서의 연구들에서 chili pepper의 경우는, Ames assay 에서 mutagenicity를 나타내지 않는다는 보고¹⁾와, 이와 상반된, 즉 mutagenicity를 가진다는 보고²⁾가 있었으며 일본의 Namiki등³⁾도, 자체만으로는 mutagenicity가 나타나지 않는다고 보고하였지만, sodium nitrite로 처리한 고추에서는 mutagenic

†To whom all correspondence should be addressed

activity를 나타내었다고 하였다. 한편, 고추의 종류에 따라 0.12-0.53%로 함유되어 있으며, 체온과 신경생리에도 영향을 미치고 hypolipidaemic, hypocholesterolaemic property를 가진다¹⁻⁷고 알려진 capsaicin에 대하여도 여러 연구가 진행되어 왔다. Toth⁸등은 capsaicin이 Ames assay에서 낮은 정도의 mutagenic activity를 나타내며 식이중에 1%까지 섭취시킨 mouse의 십이지장에서는 적은 adenocarcinoma를 보였음을 보고하였으나, Muralidhara⁹등은 dominant-lethal test와 sperm morphology assay를 이용해서 capsaicin의 non-mutagenicity를 밝힌바 있다.

이상의 보고들과 아울러 고추에는 항돌연변이 유발 및 항암성이 있는 것으로 알려진 vitamin C¹⁰⁻¹²와 β -carotene^{13,14}이 많은 양 함유되어 있음¹⁵을 생각할 때, 매일 김치등으로부터 상식하는 고추가루가 돌연변이유발 및 항돌연변이유발에 미치는 영향을 고려해 보아야 할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 매운맛과 덜 매운맛의 고추가루 추출물 자체의 돌연변이유발성과 carcinogen들에 대한 이들의 영향과 함께 고추의 주요 매운성분으로 알려진 capsaicin의 돌연변이유발성을 Ames test를 이용하여 검토하였다.

재료 및 방법

재 료

고추가루는 매운 맛의 재래종 (Red pepper powder 1)과 덜 매운맛의 교배종 Fi (Red pepper powder 2)을 경남 김해, 농촌 지도소 원예계에서 분양받아 정선하여 실험에 사용하였다.

고추 가루의 fractionation

고추 가루는 Övervik¹⁶의 방법과 같이 시료무게의 10배의 극성이 다른 용매로 각각 추출하였다. 즉 첫번째 획분(1st fraction, fat-soluble)은 CHCl₃/CH₃OH (1:1)로, 두번째 획분(2nd fraction)은 methanol로 세번째 획분은 (3rd fraction, basic) (NH₄)₂CO₃을 0.2M의 농도로 녹인 C₂H₅OH/H₂O (4:1)로 12시간 교반하여 각각 2번씩 추출하여 분획하였다.

이와같이 분획한 고추가루의 획분들은 감압 농축한 후 추출하기 전 고추가루 시료와 같은 양의 dimethyl sulfoxide나 95% methanol에 녹여 실험에 사용하였

다.

Mutagens / Chemicals

N-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)에서, aflatoxin B₁ (AFB₁)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 MNNG는 증류수에, AFB₁은 spectrophotometric dimethyl sulfoxide (DMSO, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA)에 녹여 plate당 각각 0.2 μ g 및 1 μ g의 농도로 실험에 사용하였다.

또한 고추의 대표적인 매운 성분으로 알려진 capsaicin도 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 DMSO에 녹여 plate당 3000 μ g의 농도까지 실험하였다. 실험에 사용했던 시료, mutagen, 및 chemical 들은 Maron과 Ames¹⁷의 방법에 따라 toxicity test를 한 후 실험계에서 toxicity를 나타내지 않은 범위내에서 실험하였다.

Mutagenicity test

Salmonella typhimurium LT-2의 histidine auxotroph인 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 미국 California 대학의 B. N. Ames박사로부터 제공받아 정기적으로 histidine 요구성, deep rough (*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인한 후 실험균주로 사용하였다.

Indirect mutagenicity 효과를 검토하기 위해, 약 200g의 Sprague-Dawley rat (male)와 Syrian golden hamster (male)를 이용하여 Maron과 Ames¹⁷의 방법에 따라 S9 mixture를 조제하였고, Matsushima¹⁸, Yahagi¹⁹의 방법에 따라 preincubation mutagenicity test를 하였다. 즉 S9 mix 0.5ml (indirect mutagen) 혹은 phosphate buffer 0.5ml (direct mutagen), 하룻밤 배양된 균주 (1~2 \times 10⁸ cells/ml) 0.1ml, 시료와 chemical 0.1ml를 ice bath에 담긴 cap tube에 첨가하여 가볍게 vortex하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 예비배양하였다. 45 $^{\circ}$ C의 top agar 2ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 그 revertant 숫자를 계수하였다.

통계분석

실험 data로 부터 student's t-test²⁰를 이용하여 통계분석하였다.

결과 및 고찰

고추가루를 극성이 다른 용매로 추출, 3분획한 것을 각각 2%의 농도로 조정하여 첫번째 획분(F1)은 DMSO에 녹이고, 두번째(F2) 및 세번째(F3) 획분은 methanol에 녹여 S9이 존재하지 않으면서 발암물질이 존재하지 않을 때 고추가루 자체의 돌연변이유발의 효과를 검토하여 보았다.

Fig. 1, A에 나타내었듯이 rat S9에 의한 activation이 없는 상태에서, 매운맛(Red pepper powder 1)과 덜 매운맛(Red pepper powder 2)의 고추가루, 모두 TA100의 revertant 수를 증가시키지 않았다. 이로부터 고추가루는 direct한 돌연변이 효과는 없는 것으로 사료되었다. 한편 위암을 일으킬수 있는 mutagen인 MNNG가 존재할 때도 고추가루에 의한 보돌연변이 효과는 나타나지 않았으며 (Fig. 1, B) 이때 고추가루의 매운맛과 덜 매운맛 시료의 차이도 전혀 나타나지 않았다. 하지만 소금은 MNNG에 대한 보돌연변이 효과가 있는 것으로 알려져 있다^{21,22}.

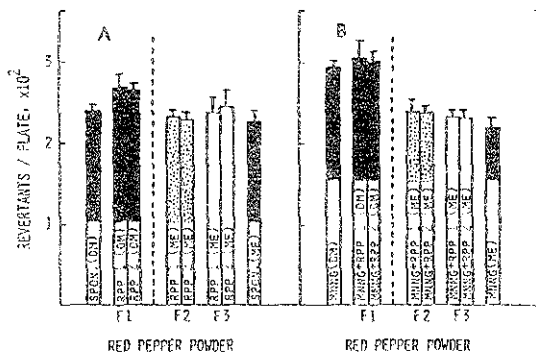


Fig. 1. The possible mutagenic effect of the extracts (fractions, F) from red pepper powders(RPP, See the text for details) in the absence of mutagens and without S9(panel A) and in the presence of MNNG (0.2 μ g/plate, panel B) in *Salmonella typhimurium* TA100. The F (fraction)I was dissolved in DM(dimethyl sulfoxide), and F2 and F3 were in ME (methanol) for the test.

Fig. 2, A는 rat S9존재시 TA98 strain에서 고추가루에 의한 돌연변이유발성을 검토한 것인데 아무런 돌연변이유발효과를 나타내지 않았으며, 고추가루의 종류에 따라서도 다른 영향이 없었다. 또한 TA100 strain의 revertant수도 대조건에 비해 증가되지 않은 것으로 보아 (Fig. 2, B) 고추가루는 indirect한 mutagenicity도 일으키지 않는 것으로 사료되었다. 이는 Namiki 등³의 chili pepper등 양념류가 그 자체로는 돌연변이유발 효과가 없었다는 보고와 일치 하였다.

고추가루의 돌연변이유발성에 영향을 끼칠 수 있는 인자는 고추내의 매운성분인 capsaicin이라 추정되어 capsaicin에 의한 돌연변이유발성을 검토하였다. Data는 나타내지 않았지만 capsaicin은 고추가루 추출물들의 결과와 같이 direct mutagenicity를 나타내지 않았다. Fig. 3에서 보는바와 같이 Aroclor 1254로 induce 시킨 rat S9존재시 TA98과 TA100 strain에서 capsaicin은 어느 농도에서는 약간의 돌연변이유발성을 보였으나 통계적인 유의성은 관찰할 수 없었다($p < 0.05$). 즉, 농도를 plate당 1 μ g에서 3000 μ g까지 증가시켜도 돌연변이유발에 유의성을 나타내지 않았으며 농도가 상당히 증가했을 경우는 돌연변이유발성이 오히려 감소하는 경향을 보여주었다. 또한, 이때 capsaicin은 고농도였지만 균주들에 대해서 toxicity를 나타내지 않았다.

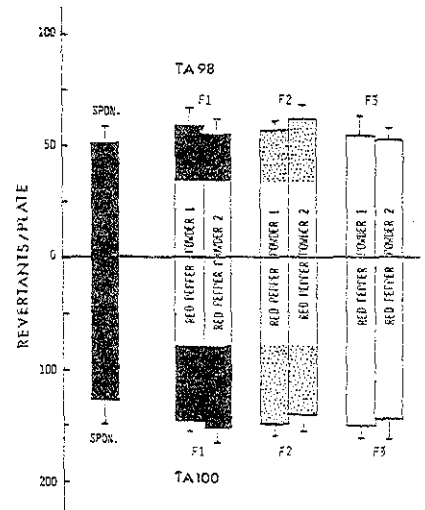


Fig. 2. The possible mutagenic effect of the extracts (fractions, F) from red pepper powders in the presence of rat S9 in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The samples were dissolved in 95% methanol for the test.

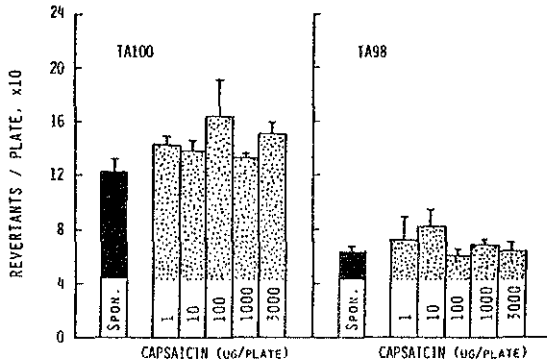


Fig. 3. The possible mutagenic effect of capsaicin (dissolved in DMSO) in the presence of rat S9 in *Salmonella typhimurium* strains of TA98 and TA100.

Mutagen중에는 그의 활성화를 위해 enzyme system의 종류에 따라 mutagenicity가 나타나는 정도가 다를수 있다²². Capsaicin이 다른 activation system에서 돌연변이유발성을 나타내는지 알아보기 위해 phenobarbital로 induce시킨 rat S9과 Aroclor 1254로 induce시킨 hamster S9 존재시 capsaicin에 의한 TA98과 TA100의 revertant 수를 검토해 보았다. Table 1에서 보는바와 같이 Aroclor 1254로 induce시킨 rat S9 존재에서 나타났던 결과와 비슷한 경향을 보였다. 즉, capsaicin의 농도를 plate당 10 μ g에서 1000 μ g까지 증가시켜도 돌연변이유발에 전혀 별다른 효과를 나타내지 않았다($p < 0.05$). 따라서 고추의 매운 주성분으로 알려진 capsaicin은 indirect한 mutagen도 아닌 것으로 사료되었다.

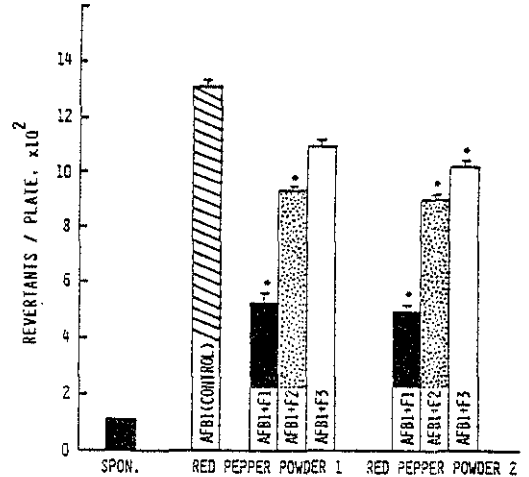


Fig. 4. Effect of solvent extracted fraction(F) from red pepper powders on the mutagenicity of aflatoxin B₁(AFB₁, 1 μ g/plate)in *Salmonella typhimurium* TA100. Each data point is the mean \pm SD for 4 samples and those asterisked surmounted on the bars are significantly different from the control at the 0.05 level of significance as determined by Student's t-test.

그래서 고추가루, 그 자체는 직접 또는 간접적인 돌연변이유발성을 가지지 않는 것으로 나타났을 뿐 아니라 고추가루에서의 매운성분인 capsaicin도 돌연변이유발 가능성이 없는 것으로 생각되었다.

한편 Fig.4에서 보는 바와 같이 고추가루 추출획분들은 AFB₁에 의해 발생하는 mutagenicity를 저해하는 효과를 나타내었다. 3분획 모두 저해 효과를 보였는데 첫번째 분획(F1)은 AFB₁의 돌연변이유발성을 약 70%정도 저해하였으며 다음이 두번째 분획(F2)이었고 세번째 분획(F3)도 다소 저해효과를 보였다. 이러한 저해효능은 매운 맛의 고추가루나 보통맛의 고추가루 사이에 전혀 차이가 나타나지 않았다. 이

Table 1. The possible mutagenic effect of capsaicin(dissolved in DMSO) in the presence of hamster S9 (induced by Aroclor 1254) and rat S9 (induced by phenobarbital) in *Salmonella typhimurium* strains of TA98 and TA100

Capsaicin Concentration/plate	Revertants / plate			
	Hamster S9(induced by Aroclor 1254)		Rat S9(induced by phenobarbital)	
	TA 98	TA 100	TA 98	TA 100
Control	46 \pm 8	162 \pm 6	27 \pm 6	174 \pm 8
10 μ g	42 \pm 5	156 \pm 6	24 \pm 5	170 \pm 5
100 μ g	43 \pm 6	158 \pm 7	23 \pm 3	169 \pm 23
500 μ g	42 \pm 7	165 \pm 6	23 \pm 5	164 \pm 14
1000 μ g	46 \pm 7	158 \pm 16	20 \pm 5	146 \pm 21

같은 저해 효과는 고추가루에 많이 함유되어 있는 것으로 알려진 비타민 C²⁰와 β -carotene²¹의 작용이 컸던 것으로 사료되고 capsaicin은 앞의 실험결과(Fig. 3, Table 1)와 같이 아무런 저지 작용이 없었던 것으로 생각되었다.

일반적으로 매운 성분을 가진 고추가루는 우리나라에 가장 흔한 위암 발생의 원인 물질중 하나가 아니었나 생각해 왔다. 그러나 고추가루는 최근에 항돌연변이 및 항암작용이 있다고 알려진 β -carotene과 비타민 C를 다량 함유하고 있기에 이와같은 연구결과는 중요한 의미를 지닌다고 하겠다. 그러므로 건강과 관련하여 고추가루에 대한 새로운 인식이 필요하다고 생각되며 이와 연관된 연구가 더욱 계속 되어야 하리라 사료된다.

요 약

고추가루의 돌연변이유발, 보돌연변이 및 항돌연변이 효과를 검토하기 위해 매운맛의 재래종과 덜 매운맛의 교배종을 극성이 다른 용매로 3분획한 것과 고추의 주요한 매운 성분으로 알려진 capsaicin을 Ames mutagenicity test를 이용하여 연구하였다. 고추가루 추출획분들은 모두 direct한 돌연변이유발성이 없는 것으로 나타났고 MNNG가 존재할 때의 보돌연변이 효과도 나타나지 않았다. 또한 이들은 rat S9이 존재할 때의 indirect한 mutagenicity도 일으키지 않는 결과를 보였다. 고추가루의 주요 매운 성분인 capsaicin도 Aroclor 1254, phenobarbital로 induce시킨 rat S9과 Aroclor 1254로 induce시킨 hamster S9 등의 activation system을 이용하여도 돌연변이유발의 효과는 나타나지 않았다. 그러나 고추가루 추출획분들은 TA100 strain에서 모두 aflatoxin B₁의 mutagenicity를 오히려 억제시키는 결과를 나타내었는데 이 효과는 고추가루의 첫번째 획분(1st fraction)이 가장 컸었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 연구비(과제번호 : 891-1508-059-1 및 과제번호 90-0500-03)지원의 일부로 수행되었으며 이에 감사를 드린다.

문 헌

- Buchanan, R. L., Goldstein, S. and Budroc, J. D. : Examination of chili pepper and nutmeg oleroesins using the *Salmonella/mammalian* microsome mutagenicity assay. *J. Food Sci.*, **47**, 330(1981)
- Nagabhusan, M. and Bhide, S. V. : Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short term tests. *Environ. Mutagen.*, **7**, 881(1985)
- Namiki, K., Yamanaka, M., Osawa, T. and Namiki, M. : Mutagen formation by nitrite-spice reactions. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 948(1984)
- Sankarikutty, B., Sumathikutty, M. A. and Narayanan, C. S. : Standardization of extraction of pungency from whole chili (*Capsicum*) for estimation of capsaicin. *J. Food Sci. Technol.*, **15**, 126(1978)
- Jancso, G. and Wollemann, M. : The effect of capsaicin on the adenylate cyclase activity of rat brain. *Brain Res.*, **123**, 323(1977)
- Sambaiah, K. and Satyanarayana, M. N. : Influence of red pepper and capsaicin on body composition and lipogenesis in rats. *J. Biosci.*, **4**, 425(1982)
- Sambaiah, K. and Satyanarayana, M. N. : Stimulation of liver triglyceride secretion in rats by capsaicin. *Curr. Sci.*, **56**, 897(1987)
- Toth, B., Rogan, E. and Walker, B. : Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers. *Anticancer Res.*, **4**, 117(1984)
- Muralidhara and Narasimhamurthy, K. : Non-mutagenicity of capsaicin in Albino mice. *Food Chem. Toxic.*, **26**, 955(1988)
- Park, K. Y., Kweon, M. H., Baik, H. S. and Cheigh, H. S. : Effect of L-ascorbic acid on the mutagenicity of aflatoxin B₁ in the *Salmonella* assay system. *Environ. Mutagens carcinogens*, **8**, 13(1988)
- Cameron, E., Pauling, L. and Leibovitz, B. : Ascorbic acid and cancer : A Review. *Cancer Res.*, **39**, 663(1979)
- Shoyab, M. : Inhibitory of the binding of 7, 12-dimethyl benz(a)anthracene to DNA of murine epidermal cells in culture by vitamin A and vitamin C. *Oncology*, **38**, 187(1981)
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. and Sporn, M. B. : Can dietary Beta-carotene materially reduce human cancer rates. *Nature*, **290**, 201(1981)
- Wolf, G. : Is dietary β -carotene an anticancer agent? *Nutrition Rev.*, **40**, 257(1982)
- 한국식품개발 연구원 : 김치의 과학 기술, 기술신서

- 제2보, 한국식품 개발연구원, p.34(1990).
16. Övervik, E., Nilsson, L., Levin, O., Nord, C. E. and Gustafsson, J. A. : High mutagenic activity formed in pan-broiled pork. *Mutat. Res.*, **135**, 149(1984)
 17. Maron, D. M. and Ames. B. N. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983)
 18. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. : Factors modulating mutagenicity in microbial test., In "Short-term test systems for detecting carcinogens", Norphth, K. H. and Garner, R. C. (eds.), Springer, Berling, p.273(1980)
 19. Yahagi, T., Nagao, M., Sugimura, T., Fuuya, A. and Matsushima, T. : Mutagenicity of purro-lizidine alkaloids in the *Salmonella*/mammalian-microsome test. *Mutat. Res.*, **68**, 211(1979)
 20. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd., Tokyo, p.187(1980)
 21. Takahashi, M., Kokubo, T, Furukawa, F., Kurokawa, Y., Tatematsu, M. and Hayashi, Y. : Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann*, **74**, 28(1983)
 22. 김소희 : 김치 성분의 보돌연변이 유발 및 항돌연변이 효과. 부산대학교 대학원 박사학위 논문(1991)
(1991년 1월 15일 접수)