

## 복숭아 효소 갈변반응 생성물의 돌연변이원성 억제효과

함승시 · 최경근

강원대학교 식품공학과

**초록** : 복숭아로부터 polyphenoloxidase를 추출하여 polyphenol 화합물인 caffeic acid, hydroxyhydroquinone, homocatechol 그리고 pyrogallol과 반응시켜 얻어진 4종류의 효소적 갈변반응 생성물의 생리작용을 검토한 결과 rec-assay와 돌연변이원성시험에서 돌연변이원성을 나타내지 않았다. 4종류의 시료모두 S-9Mix를 첨가한 돌연변이원성 억제활성 실험에서 B(a)P, Trp-P-1의 변이물질에 대한 Ca-PEBRP와 HCa-PEBRP가 80% 이상의 강한 돌연변이원성 억제활성을 나타내었음을 알 수 있었다. 또한 rec-assay에서도 강한 대조구인 MMC와 MNNG에 대해 Py-PEBRP 경우 생육저지대차를 17 mm에서 5 mm로 감소시켜 돌연변이 억제활성이 있는 것으로 나타났고, Hca-PEBRP, HHQ-PEBRP 그리고 Py-PEBRP에  $Zn^{2+}$ 의 첨가로 생육저지대의 차가 5 mm로써 DNA 손상에 영향을 미치는 것으로 나타났다(1992년 2월 18일 접수, 1992년 3월 14일 수리).

식품과 환경에 존재하는 무수한 화학물질중에서 변이원성 물질이 포함되어 있다는 것은 잘 알려진 사실이다. 이들은 대부분의 경우 여러곳에서 인간의 생활과 밀접하게 관계되어 있다. 즉 식품첨가물, 화장품, 의약품, 잔류농약, 공업화학 제품중에 널리 포함되어 있다. 대부분의 유독화학물질은 인간이 가지고 있는 효소작용으로 분해되어 독성을 잃지만 그중에는 독성이 증가되는 것도 있어 인체내에서 암이나 기타 유전독성 및 노화를 가져온다.<sup>1-3)</sup>

長尾<sup>2)</sup>은 각종 향신료, 채소류, 고사리, flavonoid류 등의 식품과 coffee, 홍차, 녹차 등에 대해서 돌연변이원성을 실험하였다. Kada 등<sup>4,5)</sup>은 綠葉의 polyphenol 성분중 catechin류가 항돌연변이 작용을 한다고 보고하였다. Ham 등<sup>6,7)</sup>은 사과, 자두에서 polyphenol oxidase를 추출하여 각종 polyphenol 화합물과 반응시켜 얻어진 갈변반응 생성물에 대해서 변이원성 실험을 한 결과 효소적 갈변반응 생성물질 모두 돌연변이원성을 억제한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 복숭아로부터 추출한 산화효소를 4종류의 polyphenol 화합물과 pH 6.2, 반응온도 30 °C에서 4일간 반응시켜<sup>8)</sup> 생성된 갈변반응생성물을 이용하여, 아미노산과 단백질의 가열분해로 생성되는 강력한 발암물질인 Trp-P-1과 석유 연소시 발생하는 B(a)P에 대한 돌연변이 억제효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 복숭아는 강원도 춘천 근교에서 수확한 倉方품종을 구입하여 4 °C에서 저장하였다가 실험에 사용하였다.

### 갈변반응 생성물의 조제

효소표품과 효소액의 조제는 大村 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라 조제하였다.

효소액의 조제는 냉동보존된 aceton powder 1g을 McIlvaine buffer(pH 6.2) 100 ml로 마쇄하여 흡입 여과 후 여액을 4 °C, 10000 rpm에서 30분간 원심분리하고 그 상등액을 취해  $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가하여 90%로 포화시킨 후 다시 원심분리하여 효소 침전을 얻었으며, 이 침전을 다시 phosphate buffer(pH 6.2)로 용해시킨 다음 동일한 완충용액으로 4 °C에서 48시간 투석하여 효소액으로 사용하였다.

갈변반응액의 조제는 鱒田 등<sup>10)</sup>의 방법에 따라 조제하였으며 기질로서는 caffeic acid(Ca), homocatechol(HCa), hydroxyhydroquinone(HHQ), pyrogallol(Py)을 사용하였고, 기질 용액농도는 caffeic acid만 10 mM 농도로 조제하고, 나머지 기질은 모두 30 mM 농도로 조제하였다.

Table 1. The result of mutagenicity test of four PEBRPs in the spore rec-assay

Test compound	Dose (μg/disc)	Inhibition zone (mm)		Difference	Conclusion
		H17(Rec <sup>+</sup> )	M45(Rec <sup>-</sup> )		
Ca-PEBRP (0.43 μg/μl)	10	8	8	0	-
	20	8	8	0	-
	30	10	11	1	±
	50	11	12	1	±
HCa-PEBRP (1.9 μg/μl)	10	8	8	0	-
	20	8	8	0	-
	30	8	8	0	-
	50	10	12	2	±
HHQ-PEBRP (2.0 μg/μl)	10	8	8	0	-
	20	8	8	0	-
	30	8	8	0	-
	50	8	8	0	-
Py-PEBRP (1.8 μg/μl)	10	8	8	0	-
	20	8	8	0	-
	30	8	8	0	-
	50	8	8	0	-
MMC <sup>a)</sup>		10	27	17	+++

<sup>a)</sup>MMC : Mitomycin C(0.2 ng/μl)

(-) : No inhibition zone, (±) : Length of inhibition zone is less than 5 mm, (+) : 5~10 mm of inhibition zone, (++) : 10~15 mm of inhibition zone, (+++) : 15~20 mm of inhibition zone

Table 2. Effects of various metal ions on the spore rec-assay of the PEBRP

Metal ion (2.5 mM)	MMC <sup>a)</sup>	PEBRP			
		Ca <sup>b)</sup>	HCa <sup>c)</sup>	HHQ <sup>d)</sup>	Py <sup>e)</sup>
None	+++	-	-	-	-
Al <sup>+++</sup>		-	-	-	-
Cu <sup>++</sup>		-	-	-	-
Fe <sup>++</sup>		-	-	-	-
Mn <sup>++</sup>		-	-	-	-
Ni <sup>++</sup>		-	-	-	-
Pb <sup>++</sup>		-	-	-	-
Zn <sup>++</sup>		-	±	±	±

<sup>a)</sup> Mitomycin C(0.2 ng/μl)

<sup>b)</sup> Caffeic acid PEBRP(0.43 μg/μl)

<sup>c)</sup> Homocatechol PEBRP(1.9 μg/μl)

<sup>d)</sup> Hydroxyhydroquinone PEBRP(2.0 μg/μl)

<sup>e)</sup> Pyrogallol PEBRP(1.8 μg/μl)

(-) : No inhibition zone, (±) : Length of inhibition zone is less than 5 mm, (+) : 5~10 mm of inhibition zone, (++) : 10~15 mm of inhibition zone, (+++) : 15~20 mm of inhibition zone

Rec-assay

*Bacillus subtilis* H17(rec<sup>+</sup>)과 M45(rec<sup>-</sup>) 두 균주의 포자 생성과 rec-assay는 Kada 등<sup>11)</sup>의 방법에 의하여 실험하였고, 양성 대조구로 MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)과 MMC(Mitomycin C)를 사용하였다.

돌연변이원성 실험

돌연변이원성 실험은 Ames 등<sup>12)</sup>의 방법을 개량한 Yahagi 등<sup>13)</sup>의 preincubation법에 따라 실험하였으며, S-9 Mix의 조제는 Carner 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 조제하여 250 ml씩 각각 첨가하였다.

돌연변이 억제실험에서 사용한 발암물질로서는 B(a)P를 20 μg/plate씩 첨가하고 육류 가열시 생성되는 Trp-P-1를 0.02 ng/plate씩 첨가하였다. 갈변물질 농도는 Ca-PEBRP 0.43 μg/μl, HCa-PEBRP 1.9 μg/μl, HHQ-PEBRP 2.0 μg/μl, Py-PEBRP 1.8 μg/μl의 농도로 조제하여 실험하였다.

결과 및 고찰

Rec-assay

양성 변이원성물질인 MMC(+++)의 경우 생육저지대의 차가 큰 반면 4종류의 EBRP(enzymatic browning reaction product) 모두 Table 1과 같이 농도의 증가에 따라 생육 저지대의 차가 2 mm 이하로서 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다. 돌연변이원성에 미치는 금속의 영향을 비교하기 위하여  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  그리고  $Zn^{2+}$ 를 2.5 mM 용액으로 조제하여 시료 용액 50  $\mu$ g과 금속이온 10  $\mu$ g을 가하여 실험한 결과 Table 2와 같이 Hca-PEBRP, HHQ-PEBRP 그리고 Py-PEBRP에  $Zn^{2+}$ 의 첨가로 생육저지대의 차가 5 mm로써 DNA 손상에 약한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

Rec-assay를 이용한 돌연변이 억제작용은 Table 3, 4에 나타난 바와같이 두 가지 양성변이원물질인 MNNG(10  $\mu$ /disc)와 MMC(2 ng/disc)의 생육 저지대 차가 각각 17 mm인 것을 MMC에 대해 Py-PEBRP를 50  $\mu$  첨가시 5 mm, MNNG에 대해서는 Ca-PEBRP를 50  $\mu$  첨가시 9 mm로 생육저지대차를 감소시켰다. 나머지 시료들도 모두 약한 생육 저지대차를 보여 돌연변이 억제효과가 있는 것으로 판단되었다.

돌연변이원성 억제효과

4종류의 갈변반응생성물 모두 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 두 균주에 대하여 변이원성이 없는 것으로 나타났으며, 강력한 발암물질인 B(a)P과 Trp-P-1에 대한 돌연변이원성 억제효과를 다음과 같은 불활성도(%)로 나타내었다.

Percentage of inhibition =

$$100 - \frac{\text{Number of revertants per plate in the presence of PEBRP}}{\text{Number of revertants per plate in the absence of PEBRP}} \times 100$$

Fig. 1은 대기 오염원이고 석유 연소시 생성되는 강력한 발암물질인 B(a)P에 대한 돌연변이원성 억제효과를 나타낸 것으로 *S. typhimurium* TA98 균주에 대해서 HCa-PEBRP를 300  $\mu$  첨가시 97%의 강한 억제 활성을 나타내었고, 50  $\mu$ 의 갈변생성물 첨가시 시료 모두 50% 이상의 억제활성을 나타낸 것을 알 수 있다. 300  $\mu$  첨가시 Ca-PEBRP는 87%, Py-PEBRP는 72% 그리고 HHQ-PEBRP는 67%의 억제활성을 나타내었다. Fig. 2는

Table 3. The antimutagenic effects of the PEBRPs on MNNG in *B. subtilis* spore rec-assay

Test compound	MNNG( $\mu$ g/ $\mu$ l)			
	Dose ( $\mu$ l/disc)	Inhibition zone (mm)		Difference
		H17(Rec <sup>+</sup> )	M45(Rec <sup>-</sup> )	
Ca-PEBRP (0.43 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	8	19	11
	20	8	19	11
	30	9	19	11
	50	9	18	9
HCa-PEBRP (1.9 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	8	21	13
	20	8	20	12
	30	8	20	12
	50	8	20	12
HHQ-PEBRP (2.0 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	8	21	13
	20	8	20	12
	30	8	20	12
	50	8	20	12
Py-PEBRP (1.8 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	8	22	14
	20	8	21	13
	30	8	21	13
	50	8	21	13
MNNG control		8	25	17

Table 4. The antimutagenic effects of the PEBRPs on MMC in *B. subtilis* spore rec-assay

Test compound	MMC(0.2 ng/ $\mu$ l)			
	Dose ( $\mu$ l/disc)	Inhibition zone (mm)		Difference
		H17(Rec <sup>+</sup> )	M45(Rec <sup>-</sup> )	
Ca-PEBRP (0.43 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	9	23	14
	20	9	20	11
	30	9	16	7
	50	9	16	7
HCa-PEBRP (1.9 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	9	25	6
	20	9	15	6
	30	9	15	6
	50	9	15	6
HHQ-PEBRP (2.0 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	9	16	7
	20	9	16	7
	30	9	16	7
	50	9	15	6
Py-PEBRP (1.8 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10	10	17	7
	20	9	16	7
	30	9	15	6
	50	9	14	5
MMC control		10	27	17

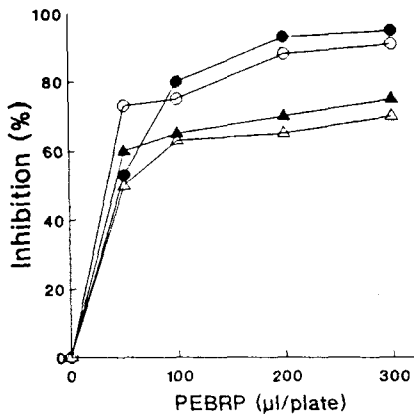


Fig. 1. Antimutagenic effects of the peach enzymatic browning reaction products on B(a)P in *Salmonella typhimurium* TA98 with S-9 Mix.

○—○ : Caffeic acid PEBRP, ●—● : Homocatechol PEBRP, △—△ : Hydroxyhydroquinone PEBRP, ▲—▲ : Pyrogallol PEBRP

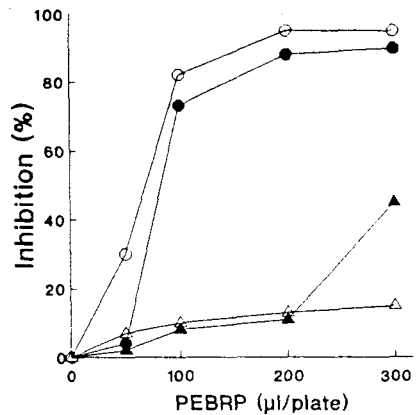


Fig. 3. Antimutagenic effects of the peach enzymatic browning reaction products on Trp-P-1 in *Salmonella typhimurium* TA98 with S-9 Mix.

○—○ : Caffeic acid PEBRP, ●—● : Homocatechol PEBRP, △—△ : Hydroxyhydroquinone PEBRP, ▲—▲ : Pyrogallol PEBRP

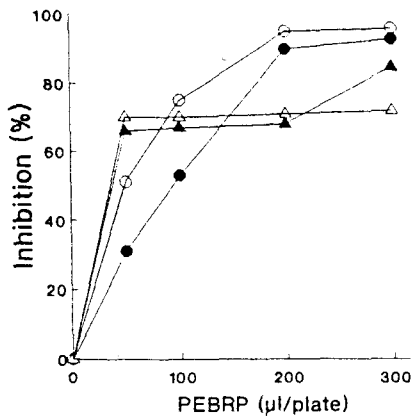


Fig. 2. Antimutagenic effects of the peach enzymatic browning reaction products on B(a)P in *Salmonella typhimurium* TA100 with S-9 Mix.

○—○ : Caffeic acid PEBRP, ●—● : Homocatechol PEBRP, △—△ : Hydroxyhydroquinone PEBRP, ▲—▲ : Pyrogallol PEBRP

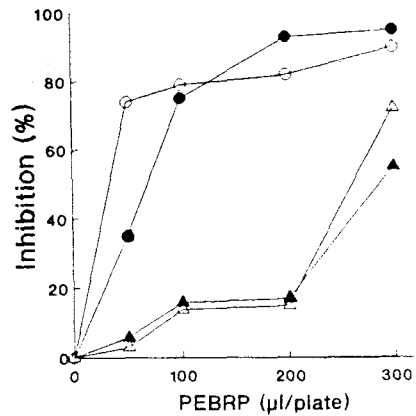


Fig. 4. Antimutagenic effects of the peach enzymatic browning reaction products on Trp-P-1 in *Salmonella typhimurium* TA100 with S-9 Mix.

○—○ : Caffeic acid PEBRP, ●—● : Homocatechol PEBRP, △—△ : Hydroxyhydroquinone PEBRP, ▲—▲ : Pyrogallol PEBRP

*S. typhimurium* TA100 균주에 대해서 실험한 것으로 갈변물질 300 μl 첨가시 Ca-PEBRP은 98%, Py-PEBRP은 82%, HHQ-PEBRP은 78% 그리고 HCa-PEBRP은 97%의 돌연변이원성 억제활성을 나타내었다. 그리고 HHQ-PEBRP의 경우 50 μl 첨가시나 300 μl 첨가시 모두 74%대의 억제활성을 나타내었다.

Fig. 3은 *S. typhimurium* TA98 균주를 이용해서 육류나 생선 가열시 생성되는 변이원물질인 Trp-P-1에 대

한 돌연변이원성 억제활성을 나타낸 것으로 HHQ-PEBRP가 20%의 약한 억제활성을 보인 반면 Ca-PEBRP와 HCa-PEBRP의 경우 각각 99, 98%의 강한 억제활성을 나타내었다.

Fig. 4는 *S. typhimurium* TA100 균주를 이용한 억제활성을 나타낸 것으로 HCa-PEBRP은 97%, Ca-PEBRP은 88%, HHQ-PEBRP은 74% 그리고 Py-PEBRP은 55%의 돌연변이원성 억제활성을 나타내었다. 특히 Ca-PEBRP

의 경우 50  $\mu$  첨가시 78%의 강한 억제활성을 나타내었다. 위와 같이 효소에 의해 생성되는 효소적 갈변반응 생성물은 기질의 종류에 따라 다소 차이가 있으나 B(a)P와 Trp-P-1과 같은 강한 변이원 물질의 활성을 억제시키는 결과를 얻었다. 또한 비효소적갈변반응의 최종 생성물인 melanodine도 B(a)P과 nitrosamine 같은 발암 물질의 활성을 강하게 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>13,16)</sup>

갈변물질에 의한 세포내에서의 억제작용에 관해서는 밝혀진 바 없으나, 세포 밖에서의 변이원성물질의 불활성화작용으로 변이원 억제활성을 나타낸 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Aeschbacher, H. V. and Wurzner, H. P. : Toxicology Letter, 5 : 139(1980)
2. 長尾美奈子 : 變異原と毒性, 4 : 20(1981)
3. McCann, J., Choi, E., Yamisaki, E. and Ames, B. N. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72 : 5135(1975)
4. Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, T. and Hara, Y. : Mutation Res., 150 : 127(1985)
5. Oguni, I., Tomita, I. and Nakamura, Y. : Taiwan Tea Symp., 28(1988)
6. 함승시, 백창원 : 한국식품과학회지, 22 : 632(1990)
7. 함승시, 홍은희, 大村浩久 : 한국식품과학회지, 19 : 212(1987)
8. Nilo de Jesus Rivas and Whitaker, J. R. : Plant Physiol., 52 : 501(1973)
9. 大村浩久, 尊田民善 : 營養と食糧, 22 : 497(1969)
10. 尊詮民善, 大村浩久, 吉川秀樹 : 九州大學農學藝誌, 29 : 71(1974)
11. Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y. : Mutation Res., 16 : 165(1972)
12. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : Mutation Res., 31 : 341(1975)
13. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M. : Mutation Res., 48 : 121(1977)
14. Garner, R. C., Miller, E. C. and Miller, J. A. : Cancer Res., 32 : 2058(1975)
15. Kim, Eun-Ho : Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ph. D. Thesis, Kyushu Univ., Japan(1985)
16. Kato, H., Lee, I. E., Chuyen, N. Y., Kim, S. B. and Hayase, F. : Agric. Biol. Chem., 51 : 1333(1987)

### Antimutagenic effects of browning products reacted with polyphenol oxidase extracted from peach

Seung-Shi Ham and Kyeong-Kun Choi(Department of Food Science and Technology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

**Abstract** : This research was carried out to investigate antimutagenic effect of peach enzymatic browning reaction products(PEBRP) obtained by reacting each of polyphenol compounds with oxidase extracted from Korea-cultivated peach. In methods, rec-assay with *B. subtilis* strains H17(rec<sup>+</sup>) and M45(rec<sup>-</sup>), and Ames test with *S. typhimurium* TA98 and TA100 were used. The spore rec-assay of PEBRP, pyrogallol, hydroxyhydroquinone, homocatechol and caffeic acid were not showed mutagenicity. In the effects of various metal ions(Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) on the rec-assay, all PEBRP except caffeic acid was increased inhibition zone(5 mm) only with Zn<sup>2+</sup>. In particular, the Py-PEBRP was decreased the difference of inhibition zone of growth on MMC(mitomycin C). In results of Ames test, all PEBRP were not showed mutagenicity on *S. typhimurium* TA98 and TA100; however, Ca-PEBRP and Hca-PEBRP were suppressed mutagenic effects on Trp-P-1 and B(a)P in the presence of S-9Mix.