

## Chitosan의 *in vitro* 돌연변이 억제효과 및 세포내 작용 특성

전향숙 · 장현주 · 이종미\*

한국식품개발연구원, \*이화여자대학교 식품영양학과

### *In vitro* Antimutagenic Activity of Chitosan and Its Bio-antimutagenic Characteristics

Hyang-Sook Chun, Hyun-Joo Chang and Jong-Mi Lee\*

Korea Food Research Institute, \*Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University

#### Abstract

The inhibitory effects of chitosan on mutagenicity induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-2), sodium azide (SA), 2-nitrofluorene (2-NF), and 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) were investigated using *Salmonella typhimurium* reversion assay and SOS chromotest. In *Salmonella typhimurium* reversion assay, Chitosan showed 24-65% of inhibitory effect against the mutagenicity of an indirect-acting mutagen, Trp-P-2. On the other hand, no inhibitory effect was observed against the mutagenicity of direct-acting mutagens (2-NF, SA). In SOS chromotest, chitosan showed 46-49% effects on SOS function induced by 4-NQO. Chitosan inhibited the mutagenicity induced by Trp-P-2 with 9-39% of inhibition rate. It was also evaluated whether inhibitory effect of chitosan is due to its bio-antimutagenic or desmutagenic action. Chitosan at high concentrations showed a bio-antimutagenicity with dose-dependent manner, but it showed a desmutagenicity at low concentrations against the mutation induced by Trp-P-2.

Key words: inhibitory effects of chitosan, *Salmonella typhimurium* reversion assay, SOS chromotest, bio-antimutagenicity

## 서 론

Chitosan은 1894년 Happer-Seyler<sup>(1)</sup>에 의해 명명된 것으로, 2-amino-2-deoxy-D-glucose가  $\beta$ -1,4 결합을 한 화학구조를 하고 있는 다당류이다. 수산 폐기물인 갑각류 껍질의 cuticle 층으로부터 얻어지는 chitin을 탈아세틸화하여 제조되는 chitosan은 그 응용범위가 넓고, 폐자원의 활용 측면에서 근래에 들어 주목받고 있는 천연 생물자원이다<sup>(2,3)</sup>. 최근에는 고품질의 chitosan 및 그 유도물질들이 개발되면서 anti-lactose intolerance<sup>(4)</sup>, 상처치유능<sup>(4)</sup> 및 항콜레스테롤 작용<sup>(5)</sup> 등 다양한 생리활성에 대한 연구결과들이 보고되고 있다. 특히 지금까지 정확한 발생기전 및 치료법이 확실하지 않은 암에 대해서도 chitin, chitosan 및 이들의 일부 oligomer가 억제활성을 나타낸다는 것이 알려지면서 많은 사람들의 관심의 대상이 되고 있다<sup>(6,7)</sup>.

암의 발생은 80-90%가 환경적 요소에 기인하고, 암의 종류 및 개인에 따라 차이가 있으나 식이와 영양이 30-60%를 차지하는 것으로 알려져 있다<sup>(8)</sup>. 미국인의 경우 하루 식사에서 약 22,500 revertant의 변이원을 섭취하고 있다는 보고<sup>(9)</sup>로 미루어 보아 간편화, 서구화 추세에 있는 우리의 식생활에서도 변이원의 섭취는 매우 높을 것으로 예상되고 있어, 암과 관련하여 변이원의 억제물질에 대한 연구가 요구되고 있다. 특히 chitosan은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 고형암의 성장을 저지하는 것으로 알려져 있는데, 이는 면역활성의 증강 및 polycationic charge에 기인된다고 하는 소수의 보고<sup>(10,11)</sup>가 있으나, 항암활성에 대한 연구는 아직 단편적인 수준으로서 발암의 개시단계에서 발생하는 돌연변이를 억제하는 활성에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. Chitosan은 분자구조내 polycationic charge를 가지고 있어서 전자친화성 발암인자의 거동에 영향을 주어 세포내 돌연변이 감수성을 조절할 수 있는 가능성이 높다는 점에서, 유전독성 물질에 의해서 야기될 수 있는 암이나 유전적 질환의 예

Corresponding author: Hyang-Sook Chun, Rice Utilization Center, Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

방적 측면에서의 이용가능성을 기대할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 chitosan의 항암 활성을 살펴 볼 목적으로 먼저 암의 메커니즘 중 개시단계에 영향을 미치는 돌연변이에 대한 억제활성을 *in vitro* *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest 시험계를 이용하여 살펴보고 그 작용방식을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

Chitosan (C-3646, practical grade from crab shells), 2-nitrofluorene (2-NF), 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) 및 sodium azide (SA)는 Sigma Chemical Co. (U.S.A) 제품을 사용하였고, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-2)는 Wako Chemical Ins. (Japan)으로부터, 구입하여 사용하였다. Aroclor 1254-induced rat liver S-9은 Organon Teknika Corp. (U.S.A) 제품을 사용하였다. 시험 균주 중 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100은 유전공학센터의 유전자 은행으로부터, *E. coli* PQ 37은 도핑 콘트롤 센터로부터 분양받아 사용하였다.

### *Salmonella typhimurium* reversion assay

Maron과 Ames의 방법<sup>(12)</sup>을 이용하였다. 즉 미리 멸균시킨 cab tube에 0.5% acetic acid에 용해시킨 다음 0.2 µm 필터로 제균시킨 시료 100 µl, 돌연변이원 100 µl, 4% S9 mix 500 µl [직접변이원의 경우, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4)], 균주 100 µl ( $1-2 \times 10^9$  cells/ml)를 넣고, 37°C에서 20분간 preincubation시켰다. 이것을 top agar 2 ml와 혼합한 후, minimal glucose agar plate에 골고루 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 배지위의 복귀 콜로니(revertant) 수를 측정하였다. 시료의 돌연변이 억제효과는 다음과 같이 계산하였다.

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

- a : 돌연변이원만 있을 때 복귀 콜로니의 수
- b : 시료와 돌연변이원을 동시에 첨가하였을 때 복귀 콜로니의 수
- c : 시료와 돌연변이원 모두 없는 경우의 복귀 콜로니의 수

첨가된 돌연변이원은 Trp-P-2가 0.1 µg/plate, SA가 4 µg/plate, 2-NF이 4 µg/plate의 농도로 사용하였다.

### SOS chromotest

Quillardet 등<sup>(13)</sup>의 방법을 이용하였다. 즉 *E. coli* PQ 37을 하룻밤동안 37°C를 유지하며 배양한 후 La 배지로 1:50 (v/v)으로 희석해서 이를 다시 배양하였다( $2 \times 10^9$  cells/ml). 이 배양액을 La 배지로 1:10으로 희석한 것을 사용하였다. 멸균한 cap tube에 시료 20 µl, 돌연변이원 20 µl, 균주와 S9 mix (직접변이원의 경우, La 배지첨가) 혼합액 0.6 ml를 넣고 37°C에서 반응시킨 후 β-galactosidase와 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 먼저 β-galactosidase측정은 시험관에 B buffer 2.7 ml를 넣고 37°C에서 5분간 평형을 유지한 후 o-nitro-phenyl-β-galactoside (ONPG) 용액을 0.6 ml 첨가하여 30분간 반응시켰다. 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액으로 반응을 정지시킨 다음 spectrophotometer로 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Alkaline phosphatase의 측정은 위와 동일한 방법으로 하되 B buffer대신에 P buffer를, ONPG 대신에 p-nitrophenyl phosphate (PNPP)를, 반응 정지액은 0.25 M HCl 1 ml의 첨가 5분 후 2 M tris buffer 1 ml를 첨가하였다. 효소 활성 단위는  $[1000 \times A_{420}(t)]$ 으로 나타냈고(t는 반응시간(분)), alkaline phosphatase unit에 대한 β-galactosidase unit의 비율을 R (ratio)값으로 나타냈다. SOS 유전자의 유도 정도(induction factor)는 R(C)/R(O)로 나타냈는데, R(C)는 돌연변이원이나 시료가 있을 때의 ratio 값이며, R(O)는 돌연변이원이나 시료가 없을 때의 ratio값으로 계산하였다.

세포내 돌연변이 억제 작용(bio-antimutagenic action)

세포내 돌연변이 억제 작용<sup>(14)</sup>을 조사하기 위하여 균주 배양액을 변이원으로 처리한 다음 shaking water bath에서 37°C, 80 rpm으로 1시간 배양하여 DNA손상을 유도하였다. 그런 다음 cold PBS (phosphated buffered saline, pH 7.2)로 3회 세척하고 PBS에 균주를 현탁( $1-2 \times 10^9$  cells/ml)한 후, *S. typhimurium* reversion assay와 동일한 방법으로 활성을 측정하였다. 세포외 돌연변이 억제(desmutagenicity)는 *S. typhimurium* reversion assay와 동일하게 수행한 다음 억제효과를 계산하였다.

### 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준편차를 계산하였고, 변이원에 의해 유도된 돌연변이에 대한 chitosan의 돌연변이 억제활성 검정은 SAS 프로그램을 사용하여 유의수준 1% 수준에서 t-test를 실시하였다.

**Table 1. Inhibitory effect of chitosan on the mutagenicity of indirect acting mutagen, Trp-P-2 (0.1 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 98**

Dose of chitosan (mg/plate)	No. of revertants	Inhibition rate (%)
Negative control <sup>1)</sup>	44±9.1	
Positive control <sup>2)</sup>	4,317±333.8	
0.10	2,483±291.8	42.9 <sup>3)</sup>
0.18	1,898±603.2	56.6 <sup>3)</sup>
0.25	2,102±222.2	51.8 <sup>3)</sup>
0.50	1,521± 85.2	65.4 <sup>3)</sup>
0.75	2,737±192.0	37.0 <sup>3)</sup>
1.00	3,319±522.4	23.4 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Dimethylsulfoxide(DMSO) was used as a negative control.

<sup>2)</sup>Trp-P-2 was used as a positive control.

<sup>3)</sup>p<0.01 compared with positive control.

## 결과 및 고찰

### *Salmonella typhimurium* reversion assay

간접변이원 Trp-P-2로 유도된 돌연변이에 대한 chitosan의 돌연변이 억제효과를 살펴본 결과는 Table 1과 같다. 즉 *S. typhimurium*에 의해 시험된 간접변이원 Trp-P-2에 대해서는 chitosan농도가 0.1, 0.18, 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0 mg/plate일 경우 각각 42.9, 56.6, 51.8, 65.4, 37.0 및 23.7%로 돌연변이 억제활성을 나타내었다. 0.1-0.5 mg/plate의 chitosan농도 범위에서는 용량-반응(dose-response) 관계를 나타내면서 저해효과를 나타내었으며, 0.5 mg/plate이상의 농도에서는 오히려 저해효과가 감소하는 경향이였다. 따라서 chitosan은 간접변이원인 Trp-P-2의 돌연변이원성과 비교할 때 약 43-65%의 유의적인 돌연변이 억제효과가 있는 것으로 나타났으며(p<0.05), 0.5 mg/plate 정도의 농도에서 활성의 최고치를 보였다. 한편, 돌연변이 억제시험과 병행하여 chitosan의 돌연변이원성을 알아본 결과, 시험한 0.1-1.0 mg/plate의 농도 범위에서 돌연변이원성은 없는 것으로 나타났(결과 미제시).

직접변이원인 2-NF 및 SA에 의해 유도된 돌연변이에 대한 chitosan의 억제활성은 Table 2와 같다. 직접변이원인 SA로 유도되는 base substitution type의 돌연변이의 경우 시험한 어느 농도에서도 chitosan에 의한 돌연변이 억제효과가 나타나지 않았다. *S. typhimurium* TA 98로 시험한 frameshift type의 경우 2-NF로 유도된 돌연변이에 대해서 시험한 chitosan농도 0.25, 0.5, 0.75, 및 1.0 mg/plate에서 각각 10.6, 4.2, 1.8, 및 7.6%의 억제활성을 나타내었다. 그러나 본 연구에서 나타난 약 2-11%의 범위의 돌연변이 저해율은 일반적인

**Table 2. Inhibitory effect of chitosan on the mutagenicities of direct acting mutagens, SA (4 µg/plate) and 2-NF(4 µg/plate) in *Salmonella typhimurium* TA 98 and 100**

Dose of chitosan (mg/plate)	2-NF		SA	
	No. of revertants	Inhibition rate (%)	No. of revertants	Inhibition rate (%)
Negative control <sup>1)</sup>	13±3.7		67±45.4	
Positive control <sup>2)</sup>	436±89.2		1,147±167.0	
0.10	505±40.2	0.0	2,029±179.9	0.0
0.18	477±35.0	0.0	1,719±34.3	0.0
0.25	391±35.0	10.6	1,863±275.9	0.0
0.50	418±26.2	4.2	1,904±209.3	0.0
0.75	428±31.6	1.8	1,677±285.2	0.0
1.00	404±14.4	7.6	1,747±66.1	0.0

<sup>1)</sup>DMSO was used as a negative control.

<sup>2)</sup>2-NF and SA as positive control were used in *Salmonella typhimurium* TA 98 and 100, respectively.

으로 생물검정시 같은 농도를 시험할 경우에도 나타날 수 있는 오차범위에 해당되며 농도-반응관계는 전혀 성립하지 않는 것으로 보아 직접변이원에 의한 돌연변이원성에 대한 chitosan의 억제효과는 없는 것으로 보인다.

### SOS chromotest

돌연변이 억제 활성은 시험법에 따라 억제율의 차이는 물론 활성 유무까지 차이가 날 수 있어 적어도 서로 다른 시험계를 사용하는 시험법에서 돌연변이 억제 활성이 일관되게 측정되어야 결과를 인정하고 해석할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 1982년 Quillardet 등<sup>14)</sup>에 의해 개발되었으며 Ames 시험과 약 90%의 높은 상관성을 나타내어 현재 널리 이용되고 있는 SOS chromotest를 이용하여 chitosan의 돌연변이 억제효과를 살펴보았다.

SOS chromotest를 이용하여 4-NQO에 의한 SOS 유도저해활성을 살펴본 것은 Table 3과 같다. 즉, chitosan농도가 0.15 mg/assay 및 0.20 mg/assay일 때 직접변이원인 4-NQO에 의해 유도된 유도지수(induction factor) 8.920을 4.226 및 4.516으로 낮추어 약 46-49%의 저해활성을 나타내었다. 반면, 0.02-0.1 mg/assay의 저농도 범위에서는 억제활성보다는 SOS 유도를 증가시키는 것으로 나타나 향후 이의 원인구명에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각되었다.

이와 같이 직접변이원에 대한 결과가 *S. typhimurium* reversion assay의 결과와 상반되게 나타난 것은

**Table 3. Inhibitory effect of chitosan on direct SOS function induced by 4-nitroquinoline oxide (1 µg/assay) in *E. coli* PQ 37**

Dose of chitosan (mg/plate)	β-Galactosidase		Alkaline phosphatase		R	Induction factor	Inhibition rate (%)
	Abs.	unit	Abs.	unit			
Negative control <sup>1)</sup>	0.16	5.5	0.53	17.7	0.31	1.000	
Positive control <sup>2)</sup>	1.25	41.4	0.48	16.1	2.57	8.290	
0.02	1.23	41.1	0.10	3.4	11.95	38.548	
0.04	1.10	36.8	0.09	3.0	12.18	39.290	
0.05	0.70	23.5	0.09	3.0	7.93	25.580	
0.10	0.30	9.9	0.10	3.2	3.07	9.903	
0.15	0.16	5.3	0.12	4.1	1.31	4.226	49.0 <sup>3)</sup>
0.20	0.15	5.1	0.11	3.6	1.40	4.516	45.5 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>DMSO was used as a negative control.<sup>2)</sup>4-Nitroquinoline oxide was used as a positive control.<sup>3)</sup>p<0.01 compared with positive control.**Table 4. Inhibitory effect of chitosan on indirect SOS function induced by Trp-P-2 (2 µg/assay) in *E. coli* PQ 37**

Dose of chitosan mg/assay	β-Galactosidase		Alkaline phosphatase		R	Induction factor	Inhibition rate (%)
	Abs.	unit	Abs.	unit			
Negative control <sup>1)</sup>	0.14	4.07	0.40	13.2	0.36	1.000	
Positive control <sup>2)</sup>	0.28	9.3	0.32	10.7	0.87	2.450	
0.020	0.25	8.5	0.34	11.3	0.75	2.106	14.3 <sup>3)</sup>
0.034	0.28	9.3	0.40	13.4	0.69	1.951	20.4 <sup>3)</sup>
0.050	0.29	9.7	0.43	14.2	0.68	1.922	21.6 <sup>3)</sup>
0.100	0.30	9.9	0.38	12.5	0.79	2.234	9.0
0.150	0.19	6.4	0.36	12.1	0.53	1.493	39.2 <sup>3)</sup>
0.20	0.18	6.1	0.31	10.2	0.59	1.672	31.8 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>DMSO was used as a negative control.<sup>2)</sup>Trp-P-2 was used as a positive control.<sup>3)</sup>p<0.01 compared with positive control.

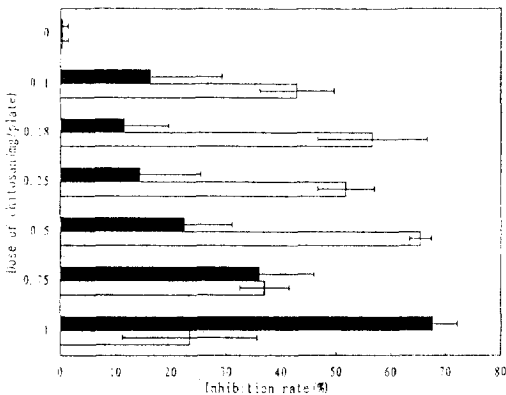
*S. typhimurium* reversion assay의 경우 2-NF 및 SA를 변이원으로 사용하였고, SOS chromotest에서는 4-NQO를 변이원으로 사용하였기 때문에 변이원 차이에 따른 것으로 생각된다. 4-NQO는 돌연변이 유발 메카니즘이 비교적 잘 알려진 물질로서 SOS 수복과정에 있어서 *umu C*, *umu D* 유전자에 의한 수복 오류로 돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 4-NQO에 의한 SOS유도에 대해 chitosan이 저해능을 나타낸 것은 chitosan이 분자구조내 polycationic charge를 가지고 있는 다당류이기 때문에 식이섬유소적 역할로 4-NQO를 불활성화시켰기 때문으로 추측된다.

간접변이원인 Trp-P-2에 의한 SOS 유도에 대한 chitosan의 억제효과는 Table 4에서 보이는 바와 같이 시험한 chitosan의 농도범위에서 약 9.39%의 저해활성을 나타내었다. 또한 chitosan 농도가 0.1 mg/assay일 경우를 제외하고는 전체적으로 chitosan 농도 증가에 따라 비례적으로 SOS유도 저해활성이 나타났다. 특히 chitosan농도가 0.15 mg/assay일 때는 단백질 열분해물로서 돌연변이 및 암을 유발하는 물질인 Trp-P-

2에 의해 유도된 유도지수 2.450을 1.493으로 낮추어 최고 활성을 나타내었다. SOS chromotest에서 나타난 Trp-P-2에 대한 저해활성은 *S. typhimurium* reversion assay에 의한 결과보다 다소 낮았지만 이는 시험계의 차이에 기인된 것으로 생각되며, 전체적인 경향은 비슷하였다.

#### 돌연변이 억제 방식

돌연변이 억제물질은 작용 방식에 따라 세포내 항돌연변이원성 물질(bio-antimutagen)과 세포외 항돌연변이원성 물질(desmutagen)로 구분되는데, 전자는 변이원이 DNA에 도달하는 것을 억제하거나 이미 DNA에 손상이 일어난 경우 세포의 DNA 수복 및 복제과정을 촉진하여 변이의 발생빈도를 낮춰 주는 역할을 하는 물질들로서 polyphenol류 등의 항산화 성분과 산화환원효소 등이 이에 속한다. 후자는 변이원이 DNA에 장애를 일으키기 전에 세포외에서 변이원 자체를 불활성화시키거나 변이원의 세포내 흡수를 억제하는 작용 및 전구물질이 변이원성 물질로 전환되는



**Fig. 1. Bio-antimutagenicity (■) and desmutagenicity (□) of chitosan on the mutagenicity induced by Trp-P-2 in *Salmonella typhimurium* TA 98**

과정을 억제하는 물질들로서 환원력이 있는 항산화제, peroxidase 등의 효소와 식이섬유 등이 포함된다<sup>(15)</sup>. 따라서 chitosan이 변이원의 작용을 억제하는 방식을 살펴볼 목적으로 Trp-P-2에 의해 DNA 손상을 유도한 다음 chitosan을 농도별로 투여하면서 세포내 억제(bio-antimutagenicity)활성을 *S. typhimurium* reversion assay로 조사한 결과는 Fig. 1과 같았다.

즉 chitosan 농도가 0.1, 0.18, 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0 mg/plate일 경우, 간접변이원 Trp-P-2에 의해 유도된 DNA 손상에 대해 각각 16.3, 11.5, 14.4, 22.3, 36.0 및 67.6%의 세포내 돌연변이 억제활성을 나타내었고, 시험한 chitosan 농도 범위에서 뚜렷한 용량-반응(dose-response)관계를 나타내었다. 반면, 세포의 돌연변이 억제(desmutagenicity)활성은 시험한 간접변이원 Trp-P-2에 대해서 chitosan 농도가 0.1, 0.18, 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0 mg/plate일 경우 각각 42.9, 56.6, 51.8, 65.4, 37.0 및 23.7%로 돌연변이 억제활성을 나타내었으며, 0.5 mg/plate 이상의 농도에서는 오히려 저해효과가 급격하게 감소하는 경향이였다. Chitosan의 세포내 억제활성을 세포의 돌연변이 억제활성과 비교할 때, 0.1-0.5 mg/plate의 저농도에서는 세포의 억제 특성이, 0.75-1.0 mg/plate의 비교적 고농도에서는 세포내 억제특성이 더 큰 경향을 나타내었다. 따라서 chitosan은 저농도에서는 주로 세포외에서 식이섬유적인 역할을, 고농도에서는 주로 세포내에서 변이원의 작용을 불활성화시키는데 작용했거나, 손상받은 DNA의 수복을 돕는 과정에 작용했을 것으로 생각되었다. 그러나 분자량이 수십만에 달하는 chitosan이 어떻게 세포내에서의 변이원 작용에 영향을 미치는가에 대한 것은 의문으로 남아 있어, 이에 대한 원인 구명 및 활성과 chitosan 분자

구조와의 관계 등에 대한 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것이다.

이와 같은 모든 결과들을 종합해 볼 때, chitosan의 돌연변이 억제활성은 *S. typhimurium* reversion assay에 의해서는 약 70%, SOS chromotest에 의해서는 약 40%로 평가되었다. 이는 같은 농도의 현미<sup>(16)</sup>, 인삼 추출물<sup>(17)</sup> 및 해조 추출물<sup>(18)</sup> 등의 억제활성과 비교해 볼 때 그 활성이 비교적 낮은 수준이었다. 본 시험에서 나타난 돌연변이 억제활성은 DNA손상의 결과인 돌연변이의 생성을 직접 측정하는 *S. typhimurium* reversion assay와 DNA손상과 돌연변이의 중간단계라 할 수 있는 SOS유도를 측정하는 SOS chromotest의 두 시험방법에 의해 평가된 것이므로 chitosan의 억제활성 결과가 의양성(false positive)일 가능성은 희박하다고 생각한다. 또한 chitosan의 억제방식은 저농도에서는 주로 세포외 억제 특성을, 고농도에서는 주로 세포내에서 변이원의 작용을 불활성화시키는 것으로 나타났다. 그러나 확실한 결론을 내리기 위해서는 향후 *in vivo* 시험계에 의한 연구가 뒤따라야 하며, 항돌연변이는 궁극적으로 항암활성 구명을 위한 기초단계이므로 여러 항암활성 시험법을 이용하여 활성을 조사하고 chitosan과 같은 고분자 물질의 체내 흡수와 관련한 억제 메커니즘에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

키토산의 *in vitro* 돌연변이 억제활성을 *Salmonella typhimurium* reversion assay와 SOS chromotest 이용하여 살펴보았다. *S. typhimurium*에 의해 시험된 간접변이원 Trp-P-2에 대해서 0.1-1.0 mg/plate의 chitosan 농도로 시험하였을 때, 24-65%의 돌연변이 억제활성을 나타내었다( $p < 0.01$ ). Chitosan 농도 0.1-0.5 mg/plate 범위에서는 용량-반응(dose-response)관계를 나타내면서 저해효과를 나타내었으며, 0.5 mg/plate 이상의 농도에서는 오히려 저해효과가 감소하는 경향이였다. 반면, 직접변이원인 SA 및 2-NF로 유도된 돌연변이에 대해서는 시험한 어느 농도에서도 chitosan에 의한 돌연변이 억제효과가 나타나지 않았다. Chitosan은 직접변이원인 4-NQO에 의한 SOS 유도에 대해 chitosan 농도가 0.15 mg/assay 및 0.20 mg/assay일 때 4-NQO에 의해 유도된 유도지수(induction factor) 8.290을 4.226 및 4.516으로 낮추어 약 46-49%의 저해활성을 나타내었다. 간접변이원인 Trp-P-2에 의한 SOS 유도에 대한 chitosan의 억제효과는 시험한 chitosan의 농도범위에서 약 9-39%의 저해활성을 나타내었으며, chitosan 농

도가 0.1 mg/assay일 경우를 제외하고는 chitosan농도 증가에 따라 비례적으로 SOS유도 저해활성이 나타났다. Trp-P-2에 의해 DNA 손상을 유도한 다음 chitosan의 세포내 억제(bio-antimutagenicity) 활성을 살펴본 결과, 저농도에서는 세포외 억제(desmutagenicity) 특성을, 0.75-1.0 mg/plate의 비교적 고농도에서는 세포내 억제특성을 나타내었다.

### 감사의 글

본 연구는 보건의료기술연구개발사업 1995년도 연구비에 의하여 이루어진 것이며, 이에 깊은 감사를 드리는 바입니다.

### 문헌

- Muzzarelli, R. A. A.: In *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, p.1 (1977)
- Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food-a challenge for food research and development. *Food Technol.*, **38**, 85 (1994)
- Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, **47**, 593 (1982)
- 김세권 : 키틴, 키토산 및 그 유도체의 제조기술과 개발 동향(제 1회). 식품공업, 106호, 63 (1990)
- Anderson, J. W. and Lin Chen, W. J.: Plant fiber, Carbohydrate and lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**, 346 (1979)
- Suzuki, K. Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, **151**, 403 (1986)
- Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(2), 784 (1988)
- Doll, R.: The lessons of life; keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.*, **52**, 2024s (1992)
- Hargraves, W. A.: Mutagens in cooked foods. In *Nutritional Toxicology*, Hathcock, J. N. (Ed.), Academic Press, New York, p.159 (1987)
- 鈴木茂生 : キチン, キトサンの應用-Biomedics としてのキチン, キトサンのオリゴ糖の免疫賦活性の検討. キチン, キトサン 研究會編, 技報堂出版, 東京, p.178 (1990)
- Sirica A. E. and Woodman, R. J.: Selective aggregation of L1210 Leukemia cells by the polycation chitosan. *J. N. C. I.*, **47**(2), 377 (1971)
- Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983)
- Quillardet, P., Huisman, O., D' Ari, R. and Hofnung, M.: SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli k-12 to measure genotoxicity. *Proc. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 5971 (1982)
- Mizuno, M., Toda, M., Ueno, N., Danno, G., Kanazawa, K. and Nataka, M.: Desmutagenicity of Dibenzofuran-quinone Derivative toward the Mutagenicity of Trp-P-2. *Agric. Biol. Chem.*, **53**(4), 959 (1989)
- Ramel, C., Alekperov, U. K., Ames, B. N., Kada, T. and Wattenberg, L. W.: Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **168**, 47 (1986)
- 전향숙, 김인호, 김영진, 김길환 : 쌀추출물의 돌연변이 억제효과. 한국식품과학회지, **26**(2), 188 (1994)
- 정규찬, 강규모, 남경수 : 인삼 Ether추출물과 Selenium이 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene의 돌연변이원성에 미치는 영향. 한국생화학회지, **19**, 193 (1986)
- Sato, T., Ose, T., Nagase, H. and Kito, H.: Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against benzo[ $\alpha$ ]pyrene in the Salmonella assay. *Mutat. Res.*, **241**, 283 (1990)

(1996년 6월 18일 접수)