

유색미 에탄올 추출물의 변이원성 및 화학적 직접변이원에 대한 항변이원 활성 검정

남석현 · 장수민¹ · 강미영^{1,*}

아주대학교 자연과학부, ¹경북대학교 식품영양학과

(2002년 7월 31일 접수, 2002년 11월 19일 수리)

국내외에서 수집 재배한 29품종 유색미의 70% 에탄올 추출물로 세포독성, 변이원성, 화학적 직접변이원 mitomycin C, 4-nitroquinoline-N-oxide, 2,4,7-trinitro-9-fluorenone에 대한 항변이원성을 측정하였다. 세포 내재성 alkaline phosphatase 활성을 지표로 유색미 추출물이 지시세포인 *E. coli* PQ 37의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 Jumlalocal, Jumlalocal-1을 포함하는 13종류의 유색미 추출물이 세포독성을 나타낸 반면 DK 1, SC-5, LK 1A-2-12-1-1 및 wx 139-3-64-20-3-1 등의 품종은 세포성장 촉진활성을 나타내었다. SOS chromotest 기법을 이용하여 유색미가 가지는 변이원성 및 항변이원성을 조사한 결과에서는 Jumlalocal-1, IR 17491-5-4-3-3 및 Jumlalocal 등의 품종이 변이원성을 유도하는 품종이었다. 화학적 직접변이원 mitomycin C, 2,4,7-trinitro-9-fluorenone 및 4-nitroquinoline-N-oxide 에 대해서 공통적으로 항변이원성 효과가 인정되는 유색미 품종은 LK 1-3-6-12-1-1, Parnkhari 203, Jumlalocal, wx 139-3-64-20-3-1, Muthumanikam, HP 883-1-1-1-B-1-1, Jumlalocal-1 등 7품종이었다.

Key words: 유색미, 화학적 직접변이원, 변이원성, 항변이원성

서 론

산업화가 진전됨에 따라 환경인자에 의한 유전적 손상으로부터 생체를 보호하는 것이 보건상 중요한 문제로 부각되고 있다. 유전적 손상의 결과 세포의 변이가 일어나고 이것이 암세포로 발전할 수 있기 때문이다. 암의 원인은 화학물질, 방사성 물질, 바이러스 등의 외적 요인과 유전적 요인, 호르몬의 부조화 등 내적 요인으로 나눌 수 있는데, 발암의 90%를 차지하는 외인성 요인으로 환경적 인자가 대부분을 차지하며 그 중 상당 부분이 음식물에서 유래한다.¹⁾ 이렇듯 일상적으로 섭취하는 식품에는 천연적 구성성분이나 인위적 처리에 의해 생성되는 화학적 성분으로 다양한 종류의 변이원이 폭넓게 존재하고 있다. 따라서 우리는 식생활을 통하여 다양한 종류의 화학적 변이원에 노출되어 있다고 할 수 있다. 그러나 식품 성분 중에는 변이원으로 작용하는 물질 뿐 아니라 이들에 대한 억제활성 물질도 함유되어 있어서 최근에 음식물에 대한 관심이 고조되면서 건강과 연관된 식품의 기능성 즉, 구성성분의 생리활성 효과의 여부가 식품선택의 기준이 되고 있는 실정이며, 약용식물 등 주로 식물성 식품에 함유되어 있는 생리활성 물질들의 변이원성 억제 효과 및 항암 효과에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.²⁻⁴⁾

주·부식의 구분이 분명한 우리의 식단에서는 다량의 쌀을 높은 빈도로 섭취하게 되므로 항변이원성 효과가 풍부한 쌀 품종을 개발 육성하여 이용한다면 국민 건강 및 보건에 기여하는

바가 크리라고 생각한다. 국내에서 유통되고 있는 유색미는 흑미, 적미, 흑향미 등이 있는데 주로 취반시 혼용하는 잡곡의 형태로 소비되고 있으며 유색미를 이용한 식재 및 강정의 제조가 시도되었으나 기대한 만큼의 기호성을 보이지 못하고 있는 실정이다.^{5,6)} 그러나 유색미는 일반미 품종에 비해서 미강층 추출물의 항산화 활성이 우수하며,⁷⁾ 항산화 성분으로서 cyanidin 3-O-β-D-glucoside 및 peonidine 3-O-β-D-glucoside 등이 보고되어 있고,^{8,9)} 수원 415 및 상해향찰 나 품종의 유색미 에탄올 추출물^{10,11)} 및 색소분획¹²⁾에서의 항산화활성 및 항암활성이 보고되는 등 건강 기능성 식품소재로서의 효용이 기대되므로 이에 대한 연구가 충분히 수행되어야 할 쌀 품종이라 할 수 있다. 본 연구는 항변이원성 및 항암효과가 우수한 유색미 품종을 선발 육성하기 위한 기초적인 연구로서, 국내외에서 수집·재배한 29종 유색미의 70% 에탄올 추출물을 시료로 하여 세포 독성 및 변이원성을 측정하고 화학적 직접변이원인 mitomycin C, 4-nitroquinoline-N-oxide, 2,4,7-trinitro-9-fluorenone에 대한 변이원성 억제효과를 검정함으로써 항변이원성 효과가 우수한 유색미 품종의 선발 및 개발 육종을 통해 건강 기능성 신소재로서의 유색미 이용을 위한 기본자료를 제시하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약. 국내외에서 수집한 유색미 29품종을 서울대학교 농학과에서 분양받았고, 대조군으로 일반미인 추청을 시중에서 구입하여 사용하였다. 품종별 쌀시료를 Grain Testing Mill(type PM 50, Satake, Japan)로 1450 rpm에서 90초간 도정하여 얻은 미강층에 5배량의 70% 에탄올을 첨가하여 40°C에서 12시간 진탕·추출하였으며, 감압 건조 후 DMSO(dimethyl

*연락처

Phone: 82-53-950-6235; Fax: 82-53-952-8263

E-mail: mykang@bh.knu.ac.kr

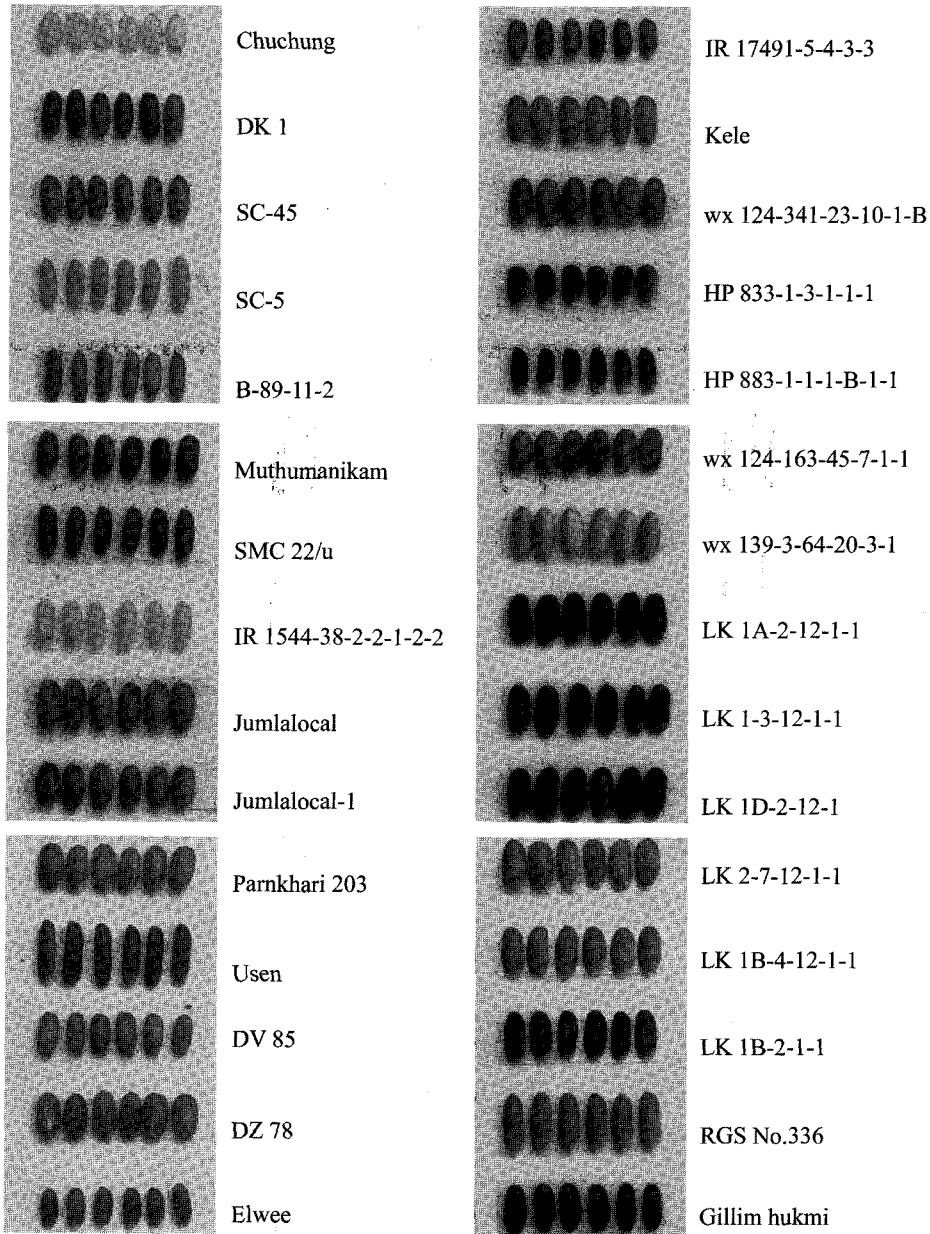


Fig. 1. The name and appearance of 30 varieties of colored rice cultivars used in this study.

sulfoxide)에 용해시켜 20 mg/ml의 농도로 만들어 시료로 사용하였다. ONPG(*o*-nitrophenyl β-D-galactosidase), PNPP(*p*-nitrophenyl phosphate), mitomycin C, NQO(4-nitroquinoline-N-oxide), TNF(2,4,7-trinitro-9-fluorenone) 등은 Sigma사(St. Louis, USA)의 제품을 사용하였고, ampicilline은 영진약품의 주사용 penbrex를 희석하여 사용하였으며, peptone, yeast extract 등의 배지용 시약은 Difco사(Detroit, USA)의 제품을 사용하였다. SOS chromotest의 지시균주인 *Escherichia coli* PQ 37(plasmid pKM 101, *sf*::Mud(AP *lac*)*cts*, *lac*ΔU169, *mal*^t, *urvA*, *galE*, *galY*, Pho^c, *rfa*/F, *thr*, *leu*, *his*, *pyrD*, *thi*, *trp*::Muc⁺, sr1300::Tn10)은 서울대학교 생약연구소에서 분양받았고, LB배지(peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%, ampicilline+)에서 배양하여 사용하였다. 지시균주의 유전형질을 확인하기 위해

서 nutrient agar에 균주를 streaking하여 UV lamp를 조사한 뒤 균 colony의 형성유무를 확인하는 *uvr* mutation test와 균주 배양액과 top agar를 혼합하여 고화한 뒤 crystal violet이 분주된 paper disk를 얹고 배양하여 disk 주변 생육지대 생성유무를 관찰하는 *rfa* mutation test를 실시하였다.

변이원성 측정. 시료가 나타내는 변이원성은 Quilladet 등,¹³⁾ Chang 등¹⁴⁾의 SOS chromotest법을 이용하여 측정하였다. LB 배지에서 37°C로 하룻밤 진탕 배양한 *E. coli* PQ 37 배양액을 신선배지로 10배수 희석한 다음 2시간 동안 진탕 배양을 계속 하였다. 신선배지로 다시 4배수 희석하고, 여기에서 0.4 ml를 취하여 유색미 추출물 4 mg을 넣고 2시간 배양하다가 배지를 첨가하여 총용량을 4 ml로 조정하고 1.5시간 재차 진탕 배양하였다. 시료 첨가로 유도된 β-galactosidase 활성의 측정을 위해

이 최종배양액에서 0.2 ml를 취해 buffer B(60 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 40 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-mercaptoethanol, SDS 1%, pH 7.0) 1.8 ml와 1.6 mg의 ONPG를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응을 유도하고 Na₂CO₃로 반응을 정지시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액 중의 세포 밀도는 alkaline phosphatase 활성을 측정하여 평가하였는데 최종배양액 0.2 ml에 1.8 ml의 buffer P(1 M Tris, 1% SDS)와 1.6 mg의 PNPP를 첨가한 다음, 37°C에서 30분간 반응시키고 0.6 N이 되도록 염산을 첨가하여 5분간 정지한 뒤 0.8 ml의 2 M Tris 용액을 넣고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 unit은 $[1,000 \times A_{420}/t, t; \text{반응시간(분)}]$ 으로 나타내었고, alkaline phosphatase 활성에 대한 β-galactosidase 활성의 비율(R factor)을 구하였다. SOS 반응의 정도를 나타내는 유도지수(IF; Induction Factor)는 RE/RC 표현하였는데, RE와 RC는 각각 실험구와 대조구에서 계산된 R값을 대입하였다.

항변이원성 측정. 실험과정은 전술한 변이원성 측정법에 기술한 방법과 유사하며 일정량의 유색미 추출물(70% 에탄올 추출물 4 mg) 이외에 화학적 변이원을 첨가하여 지시균주를 배양

한 후 alkaline phosphatase 및 β-galactosidase 활성을 측정하는 것이 변이원성 측정법과의 방법상 차이가 있다. R값이나 유도지수도 변이원성 측정의 경우와 동일한 방법으로 산정하였다.

결과 및 고찰

유색미 에탄올 추출물의 변이원성 및 지시세포의 성장에 미치는 효과. 식품 구성성분의 변이원성 및 항변이원성을 측정하기 위해서 신속하고 간편한 방법인 SOS chromotest를 사용하였다. SOS chromotest에 사용하는 지시균주인 *Escherichia coli* PQ 37은 일련의 SOS 유전자 사이에 *sfIA:lacZ*의 융합 유전자를 삽입시킨 균주로 항생제인 ampicilline에 대한 내성이 있고 돌연변이 유발물질의 균체내 흡수가 용이하다.¹³⁾ 또한 세포 DNA가 손상되면 이 손상이 수복되기까지의 일련의 반응인 SOS 반응이 증폭되게 고안되어 있는데 이때 발현되는 β-galactosidase 활성 정도를 측정하면 변이유발물질에 의한 DNA 손상으로 나타나는 SOS 반응의 유발 정도를 측정할 수 있다. 즉, 식품 구성성분이 나타내는 변이원성의 정도를 지시세포인

Table 1. β-Galactosidase activities and alkaline phosphatase activities of 70% EtOH extract of the colored rices using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell

	β-Galactosidase		Alkaline phosphatase		I factor
	OD at 420 nm	%	OD at 420 nm	%	
Control	0.209 ± 0.019	100.00	1.526 ± 0.177	100.00	1.00
Chuchung	0.175 ± 0.009	83.48	1.406 ± 0.065	92.15	0.91
DK 1	0.252 ± 0.015	120.50	2.015 ± 0.194	132.05	0.91
SC-45	0.168 ± 0.015	80.10	1.265 ± 0.084	82.88	0.97
SC-5	0.245 ± 0.035	117.08	1.927 ± 0.218	126.33	0.93
B-89-11-2	0.185 ± 0.042	88.45	1.448 ± 0.149	94.90	0.93
Muthumanikam	0.155 ± 0.020	73.93	1.302 ± 0.096	85.32	0.87
SMC 22/u	0.210 ± 0.054	100.25	1.542 ± 0.162	101.04	0.99
IR 1544-38-2-2-1-2-2	0.192 ± 0.003	91.76	1.450 ± 0.049	95.03	0.97
Jumlalocal	0.142 ± 0.020	68.00	0.943 ± 0.104	61.81	1.10
Jumlalocal-1	0.159 ± 0.024	76.03	0.959 ± 0.144	62.84	1.21
Parnkhari 203	0.146 ± 0.035	69.88	1.104 ± 0.163	72.33	0.97
Usen	0.194 ± 0.016	92.58	1.518 ± 0.132	99.49	0.93
DV 85	0.177 ± 0.033	84.51	1.311 ± 0.229	85.96	0.98
DZ 78	0.171 ± 0.030	81.46	1.300 ± 0.181	85.19	0.96
Elwee	0.178 ± 0.019	85.11	1.272 ± 0.016	83.39	1.02
IR 17491-5-4-3-3	0.184 ± 0.006	87.72	1.167 ± 0.023	76.49	1.15
Kele	0.175 ± 0.031	83.37	1.428 ± 0.186	93.62	0.89
wx 124-341-23-10-1-B	0.176 ± 0.033	84.10	1.421 ± 0.125	93.11	0.90
HP 833-1-3-1-1-1	0.196 ± 0.016	93.36	1.569 ± 0.113	102.84	0.91
HP 883-1-1-1-B-1-1	0.185 ± 0.052	88.45	1.623 ± 0.367	106.40	0.83
wx 124-163-45-7-1-1	0.175 ± 0.018	83.44	1.349 ± 0.149	88.41	0.94
wx 139-3-64-20-3-1	0.193 ± 0.012	92.09	1.694 ± 0.044	111.01	0.83
LK 1A-2-12-1-1	0.214 ± 0.005	102.02	1.741 ± 0.157	114.10	0.89
LK 1-3-6-12-1-1	0.189 ± 0.021	90.24	1.291 ± 0.169	84.65	1.07
LK 1D-2-12-1	0.178 ± 0.019	85.12	1.322 ± 0.102	86.66	0.98
LK 2-7-12-1-1	0.228 ± 0.022	108.85	1.566 ± 0.080	102.63	1.06
LK 1B-4-12-1-1	0.197 ± 0.019	94.05	1.474 ± 0.104	96.61	0.97
LK 1B-2-1-1	0.217 ± 0.049	103.41	1.564 ± 0.094	102.53	1.01
RGS No.336	0.180 ± 0.015	85.74	1.594 ± 0.196	104.46	0.82
Gillim hukmi	0.214 ± 0.022	102.05	1.513 ± 0.117	99.17	1.03

E. coli PQ 37 균주와 식품성분의 추출물을 혼합하여 일정시간 배양한 후 균주에서 발현되는 β -galactosidase 활성의 크기로서 측정할 수 있는 것이다. 한편 alkaline phosphatase는 *E. coli* PQ 37 균주에서 세포 DNA의 손상 유무에 관계없이 발현되는 효소이므로 그 활성을 측정하면 배양약내 세포 밀도를 알 수 있다. Alkaline phosphatase 활성에 대한 β -galactosidase 활성의 비율(R factor)로부터 SOS 반응의 정도를 나타내는 변이원성 유도지수(IF; Induction Factor)를 산출할 수 있으며, 이 유도지수로부터 식품에 함유되어 있는 물질들의 변이원성 유발정도 또는 변이원성 억제정도를 유추할 수 있다. 이에 본 논문에서는 우선 일반미와는 다른 특수미인 유색미가 변이원성을 가지

고 있는지의 여부를 검정하기 위해서 29품종 유색미 추출물을 첨가하여 *E. coli* PQ 37 균주를 배양하였고 β -galactosidase 활성 및 alkaline phosphatase의 활성을 측정하여 Table 1에 나타내었다.

어떠한 화학적 직접변이원의 첨가없이 유색미 추출물만을 넣고 배양한 *E. coli* PQ 37 균주의 성장정도는 유색미의 품종에 따라 차이가 있었으며, 특히 DK 1, SC-5, LK 1A-2-12-1-1 및 wx 139-3-64-20-3-1 등의 품종은 균주의 성장을 10~30% 정도 촉진하고 있었다. 이에 비해서 Jumlocal, Jumlocal-1, Parnkhari 203 및 IR 17491-5-4-3-3 등의 품종은 25% 이상 지시균주의 성장을 억제하였고 일반미 품종인 추천의 경우에는

Table 2. The effects of chemical direct mutagens using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell

	Dose (μ g/tube)	β -Galactosidase (units)	Alkaline phosphatase (units)	R-factor
Distilled water	-	7.54 \pm 0.65	57.54 \pm 5.73	0.13
Mitomycin C	0.30	21.53 \pm 2.86	16.50 \pm 2.06	1.33
2,4,7-Trinitro-9-fluorenone	0.90	12.24 \pm 2.41	13.34 \pm 2.64	0.92
4-Nitroquinoline-N-oxide	0.21	48.24 \pm 5.35	36.30 \pm 5.14	1.36

Table 3. Antimutagenicities of 70% EtOH extracts of the colored rices against mitomycin C using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell

	β -Galactosidase	Alkaline phosphatase		R factor	I factor
	(units)	(units)	(%)		
Negative control	6.91 \pm 0.50	51.19 \pm 5.79		0.14	
Positive control	19.73 \pm 2.62	14.68 \pm 1.83	100.00	1.36	1.00
Chuchung	15.20 \pm 1.19	11.71 \pm 0.71	72.61	1.30	0.95
DK 1	17.71 \pm 1.14	12.45 \pm 1.02	84.84	1.43	1.04
SC-45	12.20 \pm 1.25	9.92 \pm 1.01	67.57	1.23	0.90
SC-5	17.78 \pm 1.88	13.02 \pm 1.42	88.69	1.37	1.00
B-89-11-2	14.76 \pm 1.86	11.37 \pm 1.42	77.42	1.30	0.95
Muthumanikam	11.48 \pm 1.58	9.45 \pm 1.08	64.41	1.21	0.89
SMC 22/u	16.56 \pm 1.71	11.95 \pm 1.28	81.41	1.39	1.02
IR 1544-38-2-2-1-2-2	17.16 \pm 0.11	12.84 \pm 0.17	87.50	1.34	0.98
Jumlocal	10.02 \pm 2.18	8.55 \pm 1.41	58.27	1.16	0.85
Jumlocal-1	13.19 \pm 1.84	10.54 \pm 1.45	71.80	1.25	0.92
Parnkhari 203	9.32 \pm 1.49	8.95 \pm 1.27	60.99	1.04	0.76
Usen	14.81 \pm 1.68	11.51 \pm 1.42	78.42	1.29	0.94
DV 85	12.39 \pm 2.43	10.12 \pm 1.84	68.96	1.22	0.90
DZ 78	13.34 \pm 3.05	11.64 \pm 1.42	79.32	1.14	0.83
Elwee	14.61 \pm 2.00	11.40 \pm 1.01	77.65	1.28	0.94
IR 17491-5-4-3-3	14.64 \pm 0.25	9.68 \pm 0.21	65.96	1.51	1.11
Kele	16.95 \pm 1.87	12.70 \pm 1.21	86.54	1.33	0.98
wx 124-341-23-10-1-B	16.34 \pm 2.16	11.20 \pm 1.24	76.31	1.46	1.07
HP 833-1-3-1-1-1	15.22 \pm 1.73	11.87 \pm 1.04	80.83	1.28	0.94
HP 883-1-1-1-B-1-1	15.68 \pm 2.05	12.85 \pm 1.47	87.50	1.22	0.89
wx 124-163-45-7-1-1	16.80 \pm 2.37	12.14 \pm 0.84	82.68	1.38	1.01
wx 139-3-64-20-3-1	17.46 \pm 1.63	14.93 \pm 1.37	101.73	1.17	0.86
LK 1A-2-12-1-1	19.90 \pm 1.98	15.41 \pm 1.63	104.95	1.29	0.95
LK 1-3-6-12-1-1	7.93 \pm 1.07	8.80 \pm 0.78	59.96	0.90	0.66
LK 1D-2-12-1	18.24 \pm 1.24	13.22 \pm 1.05	90.07	1.38	1.01
LK 2-7-12-1-1	17.77 \pm 1.80	13.05 \pm 0.86	88.88	1.36	1.00
LK 1B-4-12-1-1	20.87 \pm 2.97	13.80 \pm 1.09	94.01	1.51	1.11
LK 1B-2-1-1	16.68 \pm 1.67	13.24 \pm 1.08	90.21	1.26	0.92
RGS No.336	19.18 \pm 2.09	15.02 \pm 1.14	102.35	1.27	0.93
Gillim hukmi	15.78 \pm 1.89	10.87 \pm 0.67	74.07	1.45	1.06

Table 4. Antimutagenicities of 70% EtOH extracts of the colored rices against 2,4,7-trinitro-9-fluorenone using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell

	β-Galactosidase		Alkaline phosphatase		R factor	I factor
	(units)	(units)	(%)	(%)		
Negative control	8.20 ± 0.66	62.32 ± 7.566			0.14	
Positive control	13.32 ± 2.63	14.45 ± 2.856	100.00		0.92	1.00
Chuchung	6.98 ± 1.26	11.73 ± 1.39	81.17		0.59	0.65
DK 1	8.08 ± 2.87	12.33 ± 2.76	85.32		0.64	0.70
SC-45	10.13 ± 1.20	19.95 ± 2.81	138.07		0.51	0.55
SC-5	3.27 ± 0.17	6.32 ± 0.16	43.77		0.52	0.56
B-89-11-2	7.02 ± 0.96	14.75 ± 1.80	102.06		0.48	0.52
Muthumanikam	6.39 ± 0.98	10.65 ± 1.01	73.71		0.60	0.65
SMC 22/u	9.26 ± 4.21	13.86 ± 5.25	95.93		0.64	0.70
IR 1544-38-2-2-1-2-2	2.89 ± 0.66	6.00 ± 1.24	41.53		0.48	0.53
Jumlalocal	10.86 ± 0.31	16.52 ± 0.87	114.31		0.66	0.72
Jumlalocal-1	5.87 ± 1.47	10.79 ± 1.39	74.68		0.54	0.58
Parnkhari 203	9.93 ± 2.27	18.06 ± 4.15	125.00		0.55	0.60
Usen	6.56 ± 1.78	10.98 ± 1.77	75.96		0.59	0.64
DV 85	5.05 ± 0.78	8.14 ± 1.15	56.36		0.62	0.68
DZ 78	10.18 ± 2.61	18.14 ± 4.47	125.56		0.56	0.61
Elwee	8.97 ± 3.07	15.81 ± 4.81	109.41		0.56	0.61
IR 17491-5-4-3-3	5.14 ± 0.75	7.79 ± 1.01	53.93		0.66	0.72
Kele	8.98 ± 1.84	15.40 ± 2.70	106.56		0.58	0.63
wx 124-341-23-10-1-B	9.39 ± 1.56	17.56 ± 2.15	121.54		0.53	0.58
HP 833-1-3-1-1-1	13.33 ± 1.92	23.32 ± 3.10	161.41		0.57	0.62
HP 883-1-1-1-B-1-1	10.82 ± 1.22	17.35 ± 1.43	120.06		0.62	0.68
wx 124-163-45-7-1-1	10.46 ± 2.23	17.96 ± 2.04	124.28		0.58	0.63
wx 139-3-64-20-3-1	9.58 ± 1.35	12.89 ± 2.31	89.19		0.75	0.81
LK 1A-2-12-1-1	11.72 ± 2.06	18.92 ± 2.49	130.95		0.62	0.67
LK 1-3-6-12-1-1	5.18 ± 0.72	10.03 ± 1.36	69.43		0.52	0.56
LK 1D-2-12-1	9.08 ± 1.06	15.14 ± 2.37	104.75		0.60	0.66
LK 2-7-12-1-1	9.20 ± 1.85	17.37 ± 2.47	120.21		0.53	0.58
LK 1B-4-12-1-1	8.70 ± 1.71	15.35 ± 2.64	106.26		0.57	0.62
LK 1B-2-1-1	7.52 ± 1.76	11.65 ± 3.77	80.63		0.66	0.72
RGS No.336	7.05 ± 1.35	12.10 ± 2.63	83.73		0.58	0.64
Gillim hukmi	10.78 ± 0.58	16.09 ± 0.68	111.36		0.67	0.73

약 8% 정도 세포의 성장을 저해하고 있음을 알 수 있었다.

한편 세포의 성장정도 즉, 세포 밀도에 대한 SOS 반응의 정도인 변이원성 유도지수를 살펴보면 일반미 품종인 추청의 경우 1이하로서 변이원성 억제 정도가 어느 정도 있음을 알 수 있었으며, 유색미 품종 중에서는 HP-883-1-1-1-B-1-1, RGS No.336 및 Muthumanikam 등의 변이원성 유도지수가 0.83, 0.82 및 0.87로서 일반미보다 조금 더 강하게 변이원성을 억제하고 있음을 알 수 있었다. 이에 비해서 Jumlalocal-1, IR 17491-5-4-3-3 및 Jumlalocal 등의 품종은 변이원성 유도지수가 1.1 이상으로서 변이원성을 유도하는 품종임을 알 수 있었다.

화학적 직접변이원이 유도하는 변이원성 및 지시세포의 성장에 미치는 효과. 발암의 과정은 대체로 initiation, promotion, progression의 3단계로 진행되며, initiation 단계에서는 돌연변이 유발물질인 initiator에 의해서 정상세포의 DNA에 손상이 유도되어 유전적 변이가 일어나며 잠재적 형질세포로의 전환이 일어난다. Promotion 단계에서는 promotor라는 촉진인자에 의해서 반복적인 자극을 받아 암세포로의 진행이 이루어지며 유전

자의 손상이 점차 확대되어 변이된 세포의 자기복제가 진행되고 progression 단계에서는 변이된 세포가 주위의 세포로 침입하여 혈액이나 림프를 통하여 다른 조직으로 전이된다¹⁵⁾. 이러한 발암과정 중에서 initiator로 작용하는 돌연변이 유발 물질들은 간접변이원과 직접변이원으로 크게 나눌 수 있는데 간접변이원은 체내의 간 조직에서 대사과정을 거친 후 변이원성을 나타내므로 *in vitro* 실험에서는 간 microsome 분획인 S9 mixture의 첨가에 의한 변이원의 활성화 과정이 필요하다. 이에 비해서 직접변이원은 세포의 DNA에 직접적으로 손상을 유발하므로 활성화 과정이 필요하지 않아서 변이원성 검색에 간편하게 쓰일 수 있다. 따라서 본 논문에서는 유색미 품종들의 항변이원성 효과를 검정하기 위해서 Table 2에 제시하고 있는 3종류의 직접변이원을 사용하였다. 우선 본 실험에 사용할 화학적 직접변이원의 농도가 품종별 유색미 추출물의 항변이원성을 검정하기에 적합한지 확인한 결과, Table 2와 같이 mitomycin C, 4-nitroquinoline-N-oxide, 2,4,7-trinitro-9-fluorenone 모두 지정농도로 첨가했을 때 지시세포인 *E. coli* PQ 37 균주

Table 5. Antimutagenicities of 70% EtOH extracts of the colored rices against 4-nitroquinoline-N-oxide using *E. coli* PQ 37 as an indicator cell

	β-Galactosidase		Alkaline phosphatase		R factor	I factor
	(units)	(units)	(%)	(%)		
Negative control	7.50 ± 1.02	59.10 ± 6.11			0.13	
Positive control	48.02 ± 5.33	37.26 ± 5.28	100.00		1.34	1.00
Chuchung	45.02 ± 5.40	32.66 ± 2.70	87.64		1.38	1.03
DK 1	43.55 ± 4.87	38.37 ± 4.80	102.96		1.14	0.85
SC-45	35.34 ± 2.85	23.90 ± 2.17	64.13		1.48	1.11
SC-5	45.68 ± 7.14	41.13 ± 8.99	110.39		1.13	0.84
B-89-11-2	31.83 ± 4.68	29.74 ± 4.16	79.82		1.07	0.80
Muthumanikam	33.41 ± 7.04	29.49 ± 6.43	79.15		1.14	0.85
SMC 22/u	45.90 ± 4.50	37.46 ± 4.19	100.52		1.23	0.92
IR 1544-38-2-2-1-2-2	32.52 ± 2.37	21.14 ± 3.18	56.72		1.55	1.16
Jumlalocal	21.44 ± 4.15	18.58 ± 3.28	49.87		1.15	0.86
Jumlalocal-1	25.55 ± 6.07	21.36 ± 4.83	57.33		1.19	0.89
Parnkhari 203	26.69 ± 1.51	28.44 ± 1.47	76.31		0.94	0.70
Usen	31.23 ± 7.17	22.84 ± 5.50	61.28		1.37	1.03
DV 85	23.53 ± 3.70	15.80 ± 0.94	42.39		1.49	1.11
DZ 78	33.06 ± 1.84	24.70 ± 2.32	66.28		1.35	1.01
Elwee	39.07 ± 6.75	33.26 ± 5.53	89.27		1.17	0.88
IR 17491-5-4-3-3	28.55 ± 0.36	18.15 ± 0.70	48.72		1.57	1.18
Kele	31.88 ± 7.64	21.97 ± 4.69	58.96		1.45	1.08
wx 124-341-23-10-1-B	39.87 ± 3.13	30.14 ± 1.90	80.89		1.32	0.99
HP 833-1-3-1-1-1	39.07 ± 4.78	24.03 ± 2.91	64.49		1.63	1.22
HP 883-1-1-1-B-1-1	36.90 ± 4.78	31.19 ± 3.47	83.71		1.18	0.88
wx 124-163-45-7-1-1	38.35 ± 8.12	29.13 ± 5.55	78.17		1.31	0.98
wx 139-3-64-20-3-1	35.29 ± 1.77	31.80 ± 1.80	85.33		1.11	0.83
LK 1A-2-12-1-1	48.05 ± 5.50	32.27 ± 2.80	86.59		1.49	1.11
LK 1-3-6-12-1-1	21.53 ± 4.24	18.09 ± 3.20	48.55		1.19	0.89
LK 1D-2-12-1	44.23 ± 1.92	28.71 ± 2.34	77.05		1.55	1.16
LK 2-7-12-1-1	51.76 ± 4.85	28.22 ± 2.22	75.74		1.84	1.37
LK 1B-4-12-1-1	53.75 ± 5.04	34.14 ± 3.39	91.62		1.58	1.18
LK 1B-2-1-1	43.24 ± 5.18	30.89 ± 3.38	82.91		1.40	1.05
RGS No.336	48.91 ± 4.54	32.99 ± 2.25	88.54		1.48	1.11
Gillim hukmi	44.76 ± 2.97	28.20 ± 1.93	75.69		1.59	1.19

의 SOS 반응을 유발하여 β-galactosidase 활성을 증가시키고 있었으며 증식된 세포의 밀도를 나타내는 alkaline phosphatase 활성은 변이원의 독성 때문에 저해되고 있었다. 또한 alkaline phosphatase 활성 대한 β-galactosidase 활성의 비율(R 값)이 변이원에 따라 차이는 있지만 0.9~1.3 정도로서 대조구로 사용한 증류수 처리의 경우인 0.13에 비해서 10배 정도의 차이가 있으므로 유색미 추출물의 항변이원성 검정을 수행하기에 적합한 농도라고 생각되었다.

직접변이원 mitomycin C에 대한 유색미 추출물의 항변이원성. 변이원 mitomycin C가 처리되면 균주의 성장을 나타내는 지표인 alkaline phosphatase의 활성은 51에서 15 units로 급격히 저하되었으며, 유색미 추출물이 첨가되면 품종에 따라 차이는 있으나 거의 대부분의 시료에서 positive control보다 오히려 낮은 활성을 나타내고 있어, 변이원으로 mitomycin C가 작용한 경우에는 mitomycin C의 독성에 대해서 유색미 추출물들이 긍정적인 생리활성 효과를 나타내기보다는 부정적인 방향으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 그리고 변이원성 유도활성

으로 표시되는 I-factor의 값이 1이상의 수치를 나타내는 유색미 품종은 IR 17491-5-4-3-3 및 LK 1B-4-12-1-1로서 이들은 변이원으로 mitomycin C를 처리한 경우 오히려 변이원성 촉진 효과를 나타내는 품종들임을 알 수 있다. 그러나 LK 1-3-6-12-1-1, Parnkhari 203, DZ 78, Jumlalocal, wx 139-3-64-20-3-1, Muthumanikam, HP-883-1-1-1-B-1-1, DV 85, SC-45 등의 유색미 품종은 적어도 10% 이상의 항변이원성 효과를 나타내고 있었으며, 특히 LK 1-3-6-12-1-1는 변이원 mitomycin C에 대해서 강력한 항변이성 효과를 나타내는 품종이었다.

직접변이원 2,4,7-trinitro-9-fluorenone에 대한 유색미 추출물의 항변이원성. 변이원 2,4,7-trinitro-9-fluorenone을 처리하는 경우에도 앞서 검토하였던 mitomycin C의 경우와 마찬가지로 균주의 성장을 나타내는 지표인 alkaline phosphatase의 활성 unit가 62에서 14로 급격히 저하되었는데 유색미 추출물이 첨가되었을 때는 HP 833-1-3-1-1-1, SC-45, LK 1A-2-12-1-1, DZ 78, Parnkhari 203, wx 124-163-45-7-1-1, wx 124-341-23-10-1-B, LK 2-7-12-1-1, HP 883-1-1-1-B-1-1 등 품종의 경

우 20% 이상의 세포 성장 촉진 효과가 있었고 IR 1544-38-2-2-1-2-2, SC-5, IR 17491-5-4-3-3, DV 85 등의 품종은 세포의 성장을 절반 가량 저해하고 있었다. 변이원으로 2,4,7-trinitro-9-fluorenone이 작용하는 경우에는 유색미 추출물이 다른 변이원에 비해 긍정적인 생리활성 효과를 나타내어 변이원 독성에 의한 세포의 성장저해를 완하시켰고 변이유발 정도도 낮춰서 모든 품종에서 항변이원성 효과가 나타나고 있었다.

직접변이원 4-nitroquinoline-N-oxide에 대한 유색미 추출물의 항변이원성. 화학적 변이원 4-nitroquinoline-N-oxide도 앞서 검토하였던 변이원과 마찬가지로 균주의 성장은 저해하고 있었으나, 그 저해효과가 앞서 검토하였던 변이원보다는 미약하여서 SOS chromotest에 의한 항변이원성을 측정하는데 적합한 화학적 직접변이원이라고 생각된다. 이러한 화학적 변이원 4-nitroquinoline-N-oxide가 작용하는 독성에 대해서 일부 유색미 추출물은 부정적인 효과를 나타내어 세포의 성장을 억제하고 있음을 알 수 있었는데 특히 DV 85, LK 1-3-6-12-1-1, IR 17491-5-4-3-3, Jumlocal 등의 품종은 변이원만 처리된 positive control 보다도 절반이나 낮은 세포 밀도를 나타내고 있었다. 한편 변이원성 유도활성으로 표시되는 I-factor의 값이 1 이하로 항변이원성 효과를 나타내는 유색미 품종은 Parnkhari 203, B-89-11-2, wx 139-3-64-20-3-1, SC-5, Muthumanikam, DK 1, Jumlocal, Elwee, HP 883-1-1-1-B-1-1, LK 1-3-6-12-1-1, Jumlocal-1, SMC 22/u 등이었다.

감사의 글

이 논문은 2000년-2002년도 과학재단 특정기초 연구비 지원에 의해서 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. and Folsom, A. R. (1993) Vegetables, fruits and lung cancer in the Iowa women's health study. *Cancer Res.* **53**, 536-543.
- Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M. and Hosoda, H. (1988) Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1369-1375.
- Kada, T., Kato, M. and Kiriyama, S. (1984) Adsorption of pyrolysate mutagens by vegetable fibers. *Mutation Res.* **141**, 149-152.
- Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, S., Matsuzaki, T. and Hara, Y. (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. A case of the green tea factor. *Mutation Res.* **150**, 127-132.
- Kim, D. W., Eun, J. B. and Rhee, C. O. (1998) Cooking condition and textural changes of cooked rice added with black rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 562-568.
- Kim, S. S., Kim, S. Y. and Lee, W. J. (1998) Characteristics of germinated colored rice as a potential raw material of Shikhe. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 1092-1096.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakishi, S. (1988) Chemical studies on novel antioxidants I. Isolation, fractionation and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 723-727.
- Choi, S. W., Kang, W. W. and Osawa, T. (1994) Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Foods and Biotechnology* **3**, 131-135.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu S., Kawakishi S., Choi, S. W. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2407-2411.
- Kang, M. Y., Choi, Y. H. and Nam, S. H. (1996) Inhibitory mechanism of colored rice bran extract against mutagenicity induced by chemical mutagen mitomycin C. *Agri. Chem. and Biotechnol.* **39**, 424-429.
- Nam, S. H. and Kang, M. Y. (1997) *In vitro* inhibitory effect of colored rice bran extracts against carcinogenicity. *Agri. Chem. and Biotechnol.* **40**, 307-312.
- Choi, S. W., Nam, S. H. and Choi, H. C. (1996) Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Foods and Biotechnology* **5**, 305-309.
- Quilladet, P., Huisaman, O., D'arir, R. and Hofnung, M. (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5971-5980.
- Chang, I. M., Chang, I. C., Pack, N. W. and Pyun, R. Y. (1987) Assay of potential mutagenicity and antimutagenicity of Chinese herbal drugs by using SOS chromotest and SOS umu test. Proceedings of the 1st Korean-Japanese toxicology symposium safety assesment of chemicals *in vitro*. *The Korean Soc. of Toxicology* pp. 236-248.
- Frank, L. M. and Teich, N. M. (1991) In *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer* Oxford university press. p. 155.

Screening of Mutagenicity and Antimutagenic Activity against Chemical Direct Mutagens of Ethanolic Extracts from Colored Rice Bran

Seok Hyun Nam, Su Min Chang¹ and Mi Young Kang^{1*} (*Department of Natural Science, Ajou University, Suwon, 442-749; ¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Taegu, 702-701*)

Abstracts: The cytotoxic, mutagenic and antimutagenic activities against chemical direct mutagens such as mitomycin C, 4-nitroquinoline-N-oxide, 2,4,7-trinitro-9-fluorenone of the 70% ethanol extracts of 29 colored rice varieties and chung as a control were examined. The results obtained using authentic alkaline phosphatase activity as a growth representative of the indicator cell *E. coli* PQ 37 demonstrated that the extracts of 13 kinds of colored rice varieties including Jumlalocal and Jumlalocal-1 showed strong toxic effect on the cell growth. However the extracts of DK 1, SC-5, LK 1A-2-12-1-1 and wx 139-3-64-20-3-1 seemed to have stimulatory effects on the cell growth. The mutagenicity and antimutagenicity of the colored rice varieties were screened using SOS chromotest. The mutagenic activity was detected from Jumalocal-1, IR 17491-5-4-3-3 and Jumlalocal. On the contrary, 7 samples including LK 1-3-6-12-1-1, Parnkhari 203, Jumlalocal, wx 139-3-64-20-3-1, Muthumanikam, HP 883-1-1-1-B-1-1 and Jumlalocal-1 were shown to have antimutagenic activities against the chemical direct mutagens used in this study.

Key words: colored rice, chemical direct mutagens, mutagenicity, antimutagenicity

*Corresponding author