

## 케일과 신선초 채소즙의 안전성 및 항돌연변이 효과

김종대<sup>1</sup> · 이옥환<sup>1</sup> · 이종석<sup>1</sup> · 정혜연<sup>2</sup> · 김보경<sup>2</sup> · 박건영<sup>2</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 식품생명공학과

<sup>2</sup>부산대학교 식품영양학과

### Safety Effects against Nitrite and Nitrosamine as well as Anti-mutagenic Potentials of Kale and *Angelica keiskei* Vegetable Juices

Jong-Dai Kim<sup>1</sup>, Ok-Hwan Lee<sup>1</sup>, Jong Seok Lee<sup>1</sup>, Hye-Youn Jung<sup>2</sup>,  
Bohkyung Kim<sup>2</sup>, and Kun-Young Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

**ABSTRACT** Vegetables contain high levels of nitrate, which can be converted to nitrite for reaction with secondary amines to form nitrosamines. In this study, we evaluated safety effects against nitrite and nitrosamine as well as anti-mutagenic activities of vegetable juices. To do this, the contents of nitrate, nitrite, and nitrosamines were determined in vegetable juices. The safety effects against nitrite and nitrosamine formation were also investigated under simulated human gastric conditions. The contents of nitrate and nitrite in common and organic kale and *Angelica keiskei* juices were 931~2,052 mg/kg and 13~82 mg/kg, respectively. However, seven kinds of nitrosamines were not detected in the vegetable juices. The nitrate content decreased when vegetable juices were digested under simulated human gastric conditions. Nitrosamine (N-nitrosodimethylamine) formation under simulated human gastric conditions was inhibited by addition of vegetable juices. In addition, vegetable juices, especially organically cultivated juices, showed anti-mutagenic effects in a *Salmonella* assay system. These results suggest that organically cultivated vegetable juices are a promising health-promoting source.

**Key words:** kale, *Angelica keiskei*, vegetable juices, safety, antimutagenic activity

## 서 론

채소즙이란 생채소를 마쇄(녹즙기 이용)하여 인체가 영양소를 흡수하기 쉬운 상태로 제조된 즙이며, 생채소의 영양을 가장 많이 섭취할 수 있는 방식을 구현한 식품이라 할 수 있다(1,2). 채소류에는  $\beta$ -carotene, 비타민 C 및 비타민 E 등의 비타민류와 다양한 페놀성 성분이 함유되어 항산화 활성을 포함한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(3-5). 이러한 채소는 열을 가하는 조리과정을 통해 자체 내의 효소가 불활성화되거나 각종 비타민 및 여러 미량 영양소 등이 파괴된다. 특히 비타민 C는 열처리에 의해 40~90% 손실되는 가장 민감한 영양소이므로 이러한 영양성분을 고려하였을 때 채소 및 과일은 생으로 먹는 것이 가장 이상적이다(6,7).

채소류 및 근채류는 질산염(nitrate) 함량이 높는데 질산

염은 정상인에게는 독성을 나타내지 않으며 빠르게 소변으로 배설되나 식품이나 체내(특히 타액, 소화관)에 존재하는 nitrifying bacteria에 의해 화학적으로 활성이온인 아질산염(nitrite)으로 환원된다(8). 아질산염은 헤모글로빈의 2가철( $Fe^{2+}$ ; ferrous)을 3가철( $Fe^{3+}$ ; ferric form)로 산화시켜 메트헤모글로빈(metHb)으로 전환시킴으로써 methemoglobinemia를 유발한다(9). 이러한 전환과정은 비가역적이어서 결국 산소전달에 문제를 일으키며 주로 유아들에게 이러한 기전으로 무산소증이 발생해 사망한다는 보고가 있다(10). 또한 아질산염은 산성 조건 하에서 2급 아민과 반응하여 발암성 물질인 니트로사민(nitrosamines)을 형성한다(11). 1956년에 니트로사민의 발암성이 있다고 밝혀지고 1969년에 Sander와 Burkle이 *in vivo*에서 주입된 2차 아민(amines)과 아질산염이 발암성인 니트로사민을 생성한다고 주장한 이후 니트로사민의 생성 기전 및 생성 억제인에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(12-14). 그 결과 비타민 C를 비롯하여  $\alpha$ -tocopherol, 페놀 화합물은 nitrosating agent를 빠르게 파괴하거나 반응성 없는 물질로 환원시켜 니트로사민 생성을 감소시킨다고 보고되고 있다(15,16). 녹황색 채소의 섭취가 암 발생, 특히 위암 발생을 감소시킨다

Received 24 March 2014; Accepted 6 June 2014

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2839

고 보고되고 있으며(17-19), 채소의 비타민 C와 페놀 화합물이 위장 내에서 니트로소화를 저해하기 때문이라고 보고되어 있다(20). 그러나 최근 질소 시비의 과다로 인해 과채류의 종류에 따라 질산염의 농도가 지나치게 높아 생체 내에서 니트로사민의 생성을 오히려 촉진시킬 수도 있다고 보고되고 있다(15).

채소즙의 재료로는 다양한 과채류가 이용되고 있으며, 특히 케일, 신선초, 당근, 미나리, 샐러리, 양배추 등의 녹색채소가 주를 이루고 있다. 따라서 이러한 채소즙의 섭취가 소화 시에 아질산염 및 발암성 니트로사민 생성 억제에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다. 본 연구에서는 유기농 및 일반농 케일과 신선초 착즙액의 질산염, 아질산염 및 니트로사민 함량을 평가하였고, 인공위액에서의 소화과정 중 채소즙의 질산염, 아질산염의 변화 및 N-nitrosodimethylamines(NDMA) 생성 억제 효과를 살펴보았다. 또한 채소즙의 항돌연변이 효과를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 유기농 및 일반농 케일과 신선초는 지역 마트에서 구입하여 사용하였다. 케일과 신선초는 흐르는 물로 3회 씻은 다음 증류수로 다시 씻은 후에 녹즙기(NJE-2004R, NUC Co., Daegu, Korea)로 마쇄하여 실험에 사용하였다. 마쇄된 착즙액은 4°C, 9,000 rpm에서 30분간 원심 분리 하여 얻은 상등액을 4°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

### 시약 및 실험장치

D-Biotin, L-histidine·HCl(monohydrate), D-glucose-6-phosphate(mono sodium salt), NADP(sodium salt)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Bacto nutrient broth(dehydrated)와 Bitek agar는 Difco Laboratories(Detroit, MI, USA)로부터 구입하였다. 직접돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하여 증류수에 녹여서 사용하였다.

### 유기농 채소즙의 안전성 측정

**질산염(nitrate) 정량:** 질산염 함량은 spectrophotometric method로 분석하였다. 먼저 시료 5 g에 증류수 45 mL를 넣어 마쇄하고 60분간 95~100°C에서 중탕하여 15%  $K_4(Fe(CN)_6)$  1 mL와 2 M  $ZnSO_4$  2 mL를 첨가한 다음 여과하였다. 여과된 sample 용액 2 mL에 혼합산( $H_2SO_4 : H_3PO_4=1:1$ ) 15 mL와 0.12% 2,6-dimethylphenol-acetic acid 2 mL를 첨가하여 324 nm에서 흡광도를 측정하였다(21).

**아질산염(nitrite) 정량:** 아질산염과 aromatic amine의

결합으로 생성되는 유색의 azo 화합물에 대한 비색 정량법을 사용하였는데 즉, 마쇄한 시료 10 g에 탈색과 제단백제로 0.5 N NaOH 용액 5 mL와 10%  $ZnSO_4$  용액 5 mL를 가하고 물로 100 mL가 되게 한 후 이것을 Toyo paper No.5C (Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA)로 여과하여 여과액 10 mL에 0.5% sulfanilamide 용액 0.5 mL와 6 N HCl 용액 0.2 mL를 가한 후 실온에서 15분간 방치하다가 spectrophotometer를 이용하여 파장 540 nm에서 표준곡선을 사용하여 비색 정량하였다(22).

**니트로사민(N-nitrosamine) 함량 측정:** 시료의 추출은 Hotchkiss 등(23)의 방법을 개량한 Sung 등(24)의 방법으로 수증기 증류법에 따라 추출하였다. 즉 25 g의 시료를 정평하여 내부표준물질로 1.0 mL의 N-nitrosodipropylamine(NDPA, 1.54 µg/kg)을 가하여 수증기 발생장치에서 증류물이 150 mL가 될 때까지 추출한 다음 dichloromethane(DCM, 60 mL×3)으로 이행시켜 망초로 탈수시키고, Kuderna-Danish 장치에서 질소가스로 1 mL까지 농축하여 GC(Model 6890N, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)-TEA(thermal energy analyzer; Model 510, Thermo Electron Co., Beverly Hills, CA, USA)로 니트로사민을 분석하였다. GC-TEA의 칼럼은 Ultra 25% phenyl methyl siloxane으로 충전한 칼럼(Model Agilent 19091B-102)을 사용하였고, oven 온도는 80~250°C (10°C/min)로 하였으며, He 가스의 유속은 0.6 mL/min, injection port 온도는 260°C, pyrolyzer 온도는 550°C, interface 온도는 200°C, 압력은 15.74 psi로 하였다. 상기 GC-TEA의 조건 하에서 7종의 표준물질(N-nitrosodimethylamine, NDMA; N-nitrosodiethylamine, NDEA; N-nitrosodipropylamine, NDPA; N-nitrosodibutylamine, NDBA; N-nitrosopiperidine, NPPI; N-nitrosopyrrolidine, NPYR; N-nitrosomorpholine, NMOR)의 분리 여부를 시험하였고, NDMA의 동정은 GC-TEA의 chromatogram에서 머무름 시간(retention time)이 표준물질의 NDMA와 동일한 peak인지 여부를 co-injection으로 확인하였다.

### 인공소화 시 질산염, 아질산염 및 니트로사민 변화 분석

**인공위액 조성:** 인공위액은 United States Pharmacopeia에서 제안한 방법에 따라 NaCl 2.0 g과 pepsin 3.2 g을 증류수 500 mL에 녹인 후 7.0 mL의 HCl(30%)을 가한 다음 증류수로서 1,000 mL로 만들어 1 N HCl로 pH를 1.2로 조절하였다(25).

**인공소화 시료 제조:** 25 g의 시료에 인공위액 40 mL를 가한 후 3 N HCl로 pH 2.5로 조정하였다. 37°C에서 2시간 동안 유지시킨 후 니트로사민(N-nitrosamine) 분석용 시료로 사용하였다.

**질산염, 아질산염 및 니트로사민 함량 측정:** 질산염, 아질산염 및 니트로사민의 변화량은 상기의 방법과 동일하다.

**유기농 채소즙의 항돌연변이 효과 측정**

**균주:** *Salmonella* Typhimurium LT-2 histidine 영양요구성인 *Salmonella* Typhimurium TA100을 실험에 사용하였다. 이 균주는 모균의 histidine operon에서 돌연변이된 것으로 돌연변이 물질을 보다 효과적으로 검출하기 위해 세포벽의 lipopolysaccharide(LPS)가 부분적으로 손실된 deep rough(rfa) 돌연변이, DNA excision repair system에 대한 gene coding이 부분적으로 결여된 uvrB deletion 돌연변이 그리고 ampicillin에 대해 내성을 가지는 plasmid pKM101을 가지는 균주이다. *Salmonella* Typhimurium TA100은 histidine 생합성의 첫 번째 enzyme을 coding하는 his G gene에 돌연변이를 일으켜 wide type  $\text{CAGC}$  (leucine)이  $\text{CGCC}$  (proline)으로 치환되어 있다. 그러므로 *Salmonella* Typhimurium TA100은 주로 이들 G-C pair들의 하나에서 base-pair substitution을 일으키는 돌연변이 물질을 검출하기 위해 쓰인다. 그리고 이들 실험균주들은 새로운 frozen permanent가 준비되었을 때나 매 실험 직전 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 Maron과 Ames(26)의 방법으로 확인하여 사용하였다.

**실험방법:** 본 실험에서 주로 이용하였던 preincubation test는 phosphate buffer 용액(0.5 mL), 하룻밤 배양된 균주( $1 \sim 2 \times 10^9$  cells/mL) 0.1 mL, 희석된 시료(50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L)와 돌연변이 유발물질(MNNG, 50  $\mu$ L)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex한 후 37°C에서 30분간 예비 배양하였다. 45°C의 top agar 2 mL씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다. 한편 실험에 사용된 시료와 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다. 돌연변이 억제 효과의 정도(inhibition rate)는 아래 식에 의해 계산하였다(26).

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

- a: 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수 (MNNG, control)
- b: 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수 (MNNG+ samples)
- c: 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수(spontaneous)

**통계 분석**

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 그 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistical Analysis System(v8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하였다.

**결과 및 고찰**

**유기농 및 일반농 채소즙의 안전성 연구**

**채소즙의 질산염 함량 측정:** 질산염은 질소(N) 원자 1개와 산소(O) 원자 3개의 화학적 결합으로 NO<sub>3</sub>를 말한다. 환경계에 존재하는 질산염은 “natural”과 “unnatural” 급원이 있다. 자연적인 급원의 형태는 채소, 과일 등 식물체에 존재하는 질산염으로 식물 성장을 위해 질소를 공급받는 질소고정화 과정의 결과로 존재한다. 따라서 과채류의 질산염 함량은 자연적인 함량으로 질소고정화 과정의 진행 정도와 고정화된 질소의 대사과정에 의해 좌우되며, 식물의 품종, 종류, 부위, 토양의 비옥도, 온도, 강수량, 일조량, 온실 또는 야외 등의 재배환경과 비료 사용량, 저장 조건에 따라 함량의 차이가 크다(27). 케일의 경우 유기농이 일반농 케일에 비해 약간 높은 질산염 함량을 나타냈는데, 유기농 농업이 활기를 띠기 시작한 예전의 연구와 비교해 보았을 때 유기농 케일의 질산염 함량이 4,523 ppm, 일반농 케일이 1,575 ppm으로 다소 차이를 보이거나 케일의 경우는 다른 채소에 비해 월등히 질산염 저하의 경향을 나타내고 1997년부터는 유기농업으로 재배된 채소에서 높았던 질산염 함량이 점차 낮아지고 있는 추세라고 한다(28). 본 실험의 결과 일반농과 유기농 케일즙의 질산염 함량은 1,851.6 mg/kg, 2,052.3 mg/kg으로 큰 차이가 나타나지는 않았다(Table 1). 신선초의 질산염 함량을 비교해 본 결과 유기농 신선초의 질산염 함량은 kg당 931.5 mg으로 일반농 신선초에서 검출된 kg당 1,556.2 mg에 비해 질산염 함량이 현저히 낮았다(Table 1).

**채소즙의 아질산염 함량 측정:** 질산염은 장내에서 아질산염으로 환원되고 이는 다시 체내에 존재하는 아민류와 반응하여 발암물질인 니트로사민을 형성하는 것으로 알려져 있다(29). 니트로사민의 생성 반응속도는 아민 농도와 아질산염 농도의 제곱에 비례하기 때문에 아질산염은 발암성 물질인 니트로사민의 생성에 가장 중요한 전구물질로 알려지고 있다. 국내에서는 천연식품 추출물에서 아질산염의 소거에 대한 연구가 많이 진행되어 해조류, 버섯류, 기호음료, 차류, 약용식물, 채소류 등의 추출물에 의한 아질산염 소거능이

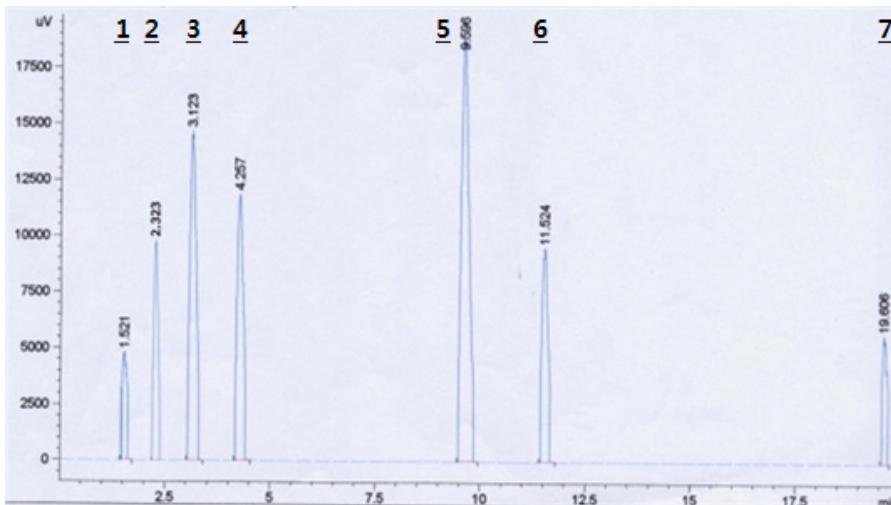
**Table 1.** Contents of nitrate, nitrite, and N-nitrosamine in common and organic vegetable juices

Samples	Nitrate (mg/kg)	Nitrite (mg/kg)	N-Nitrosamine (NA) <sup>1)</sup>
Common kale	1,851.6±342.1	28.6±3.3	ND <sup>2)</sup>
Organic kale	2,052.3±102.5	22.9±3.3	ND
Common <i>A. keiskei</i>	1,556.2±46.0	81.9±4.5	ND
Organic <i>A. keiskei</i>	931.5±85.2*	13.3±3.3*	ND

\*Significant differences were compared with common samples at  $P < 0.05$ .

<sup>1)</sup>The following seven N-nitrosamines were investigated in this study: N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodipropylamine, N-nitrosodibutylamine, N-nitrosopiperidine, N-nitrosopyrrolidine, N-nitrosomorpholine.

<sup>2)</sup>ND: not detected.



**Fig. 1.** Chromatograms of various standard nitrosamines by GC-TEA. 1, N-nitrosodimethylamine; 2, N-nitrosodiethylamine; 3, N-nitrosodipropylamine; 4, N-nitrosodibutylamine; 5, N-nitrosopiperidine; 6, N-nitrosopyrrolidine; 7, N-nitrosomorpholine.

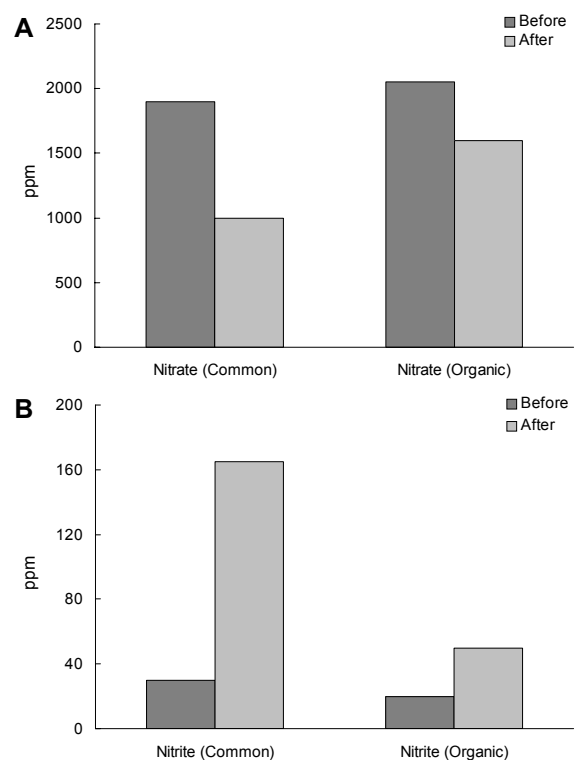
보고되고 있다(29). 유기농 케일(22.9 mg/kg)은 일반농 케일(28.6 mg/kg)과 유사한 아질산염 함량을 나타냈다(Table 1). 유기농 신선초(13.3 mg/kg)는 일반농 신선초(81.9 mg/kg)에 비해 낮은 아질산염 함량을 나타냈다(Table 1). 일반적으로 케일 채소즙보다는 아질산염의 함량이 낮게 나타났다.

**채소즙의 니트로사민 함량 측정:** 니트로사민은 지금까지 323종이 알려져 있으며, 이 중 87%가 어류, 조류, 햄스터, 토끼, 고양이, 개 및 영장류를 포함한 40여 종의 동물에서 암을 유발한다고 보고되어 있다(30). 니트로사민 중 NDMA는 휘발성 성분으로서 식품 중에서 흔히 발견될 뿐만 아니라 동물의 중앙 유발에도 매우 민감한 것으로 밝혀져 있어 연구의 대상이 되고 있다(31). 니트로사민 생성은 식품이나 기질 중에 존재하는 전구물질의 농도에 의해 좌우된다. 즉 아민의 농도에 비례하며 아질산염 농도의 제공에 비례하므로 아질산염과 반응할 수 있는 어떤 화합물이 존재할 경우 니트로사민의 생성이 촉진되거나 억제될 수 있다(32,33). 7종의 표준물질 혼합액(NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR, NMOR)을 동일 조건에서 분석한 결과 모든 채소즙에서 니트로사민은 검출되지 않았다(Table 1). Fig. 1은 GC-TEA를 이용하여 니트로사민의 종류를 실험한 표준 peak를 나타내고 있다.

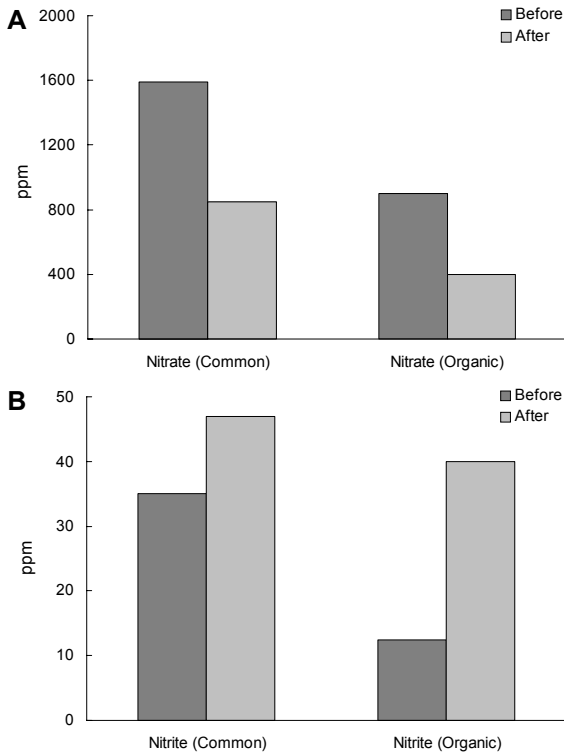
#### 인공소화 시 채소즙의 질산염, 아질산염의 변화 및 NDMA 생성 억제 효과

**인공소화 시 질산염 및 아질산염의 함량 변화:** 질산염은 *in vivo*에서 다른 화합물로 대사되지 않고 위장관과 구강에서 질산염을 아질산염으로 환원시키는 효소인 nitrate reductase 효소를 갖는 세균의 작용에 의해 아질산염으로 환원된다(34). 채소류 및 과실류의 아질산염 분해 작용이 pH 1.2에서 가장 크다고 보고한 바 있으며 그 외 많은 연구에서도 채소나 비타민 C는 낮은 pH에서의 아질산염 소거능이 우수함을 보고하였다(35). 아질산염 소거능이 가장 높은 pH

1.2는 인체 위액과 같은 조건이므로 채소즙을 섭취하였을 때 위액에서의 반응에 의해 질산염 및 아질산염 함량의 변화를 알아보기 위해 인공소화를 시킨 결과 일반농 및 유기농 케일 채소즙의 경우 모두에서 질산염 함량은 인공소화 전에 비해 낮아졌고, 인공소화 후 아질산염 함량을 살펴본 결과 일반농 케일 채소즙과 비교 시 유기농 케일 채소즙에서 3배 가량 적은 아질산염 함량을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 일반농 및 유기농 신선초의 경우도 마찬가지로 일반농 및 유기농 모든 신선초 시료군에서 질산염 함량은 인공소화 전에 비해



**Fig. 2.** Changes of nitrate (A) and nitrite (B) content in kale juices before and after exposure to the simulated gastric digestion.



**Fig. 3.** Changes of nitrate (A) and nitrite (B) content in *Angelica keiskei* juices before and after exposure to the simulated gastric digestion.

낮아졌고, 아질산염 함량 역시 모든 시료군에서 인공소화 후 증가하였다. 인공소화 후의 아질산염 함량을 살펴본 결과 일반농에 비해 유기농 신선초 채소즙에서 약간 적은 아질산염 함량을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 아질산염의 경우 인공소화 전보다 후가 약간 높아진 것으로 나타나 위에서 질산염이 아질산염으로 전환되는 현상이 일어났을 것이라 추측된다.

**NDMA의 생성 억제 효과:** 체내에서 니트로사민은 diazo-oalkane으로 전환되어 핵산, 체단백질 및 기타 세포 내의 성분을 알킬화시킴으로써 발암성을 나타낸다. 니트로사민의 주요 전구물질은 아민과 아질산염이며 이 중 아민은 1급, 2급 및 3급 모두가 니트로사민 생성에 관여하며, 2급 아민은 diazonium ion과 1급 아민의 반응에 의해 니트로사민을 생성하거나 직접 그 자신이 니트로사민 생성의 전구물질로 작용한다. 아질산염은 적절한 산성 조건에서 nitrous acid (HNO<sub>2</sub>)를 형성하며 계속해서 nitrous anhydride(N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), nitrous acidium ion(H<sub>2</sub>ONO<sup>+</sup>) 및 nitrosonium ion(NO<sup>+</sup>)으로 전환되어 강력한 니트로산화(nitrosation) 물질이 된다(36). 따라서 니트로사민이 쉽게 생성되는 최적 pH가 인체 위의 pH(gastric pH) 조건과 유사하므로 인공소화 상태에서 100 mM의 NaNO<sub>2</sub>와 200 mM dimethylamine을 반응시켜 NDMA 생성 후 억제능을 알아보았다. 유기농 케일 채소즙 10 mL를 첨가한 경우 NDMA 생성 억제율이 64.0%로 나타났고, 50 mL를 첨가한 경우는 85.9%로 나타났다

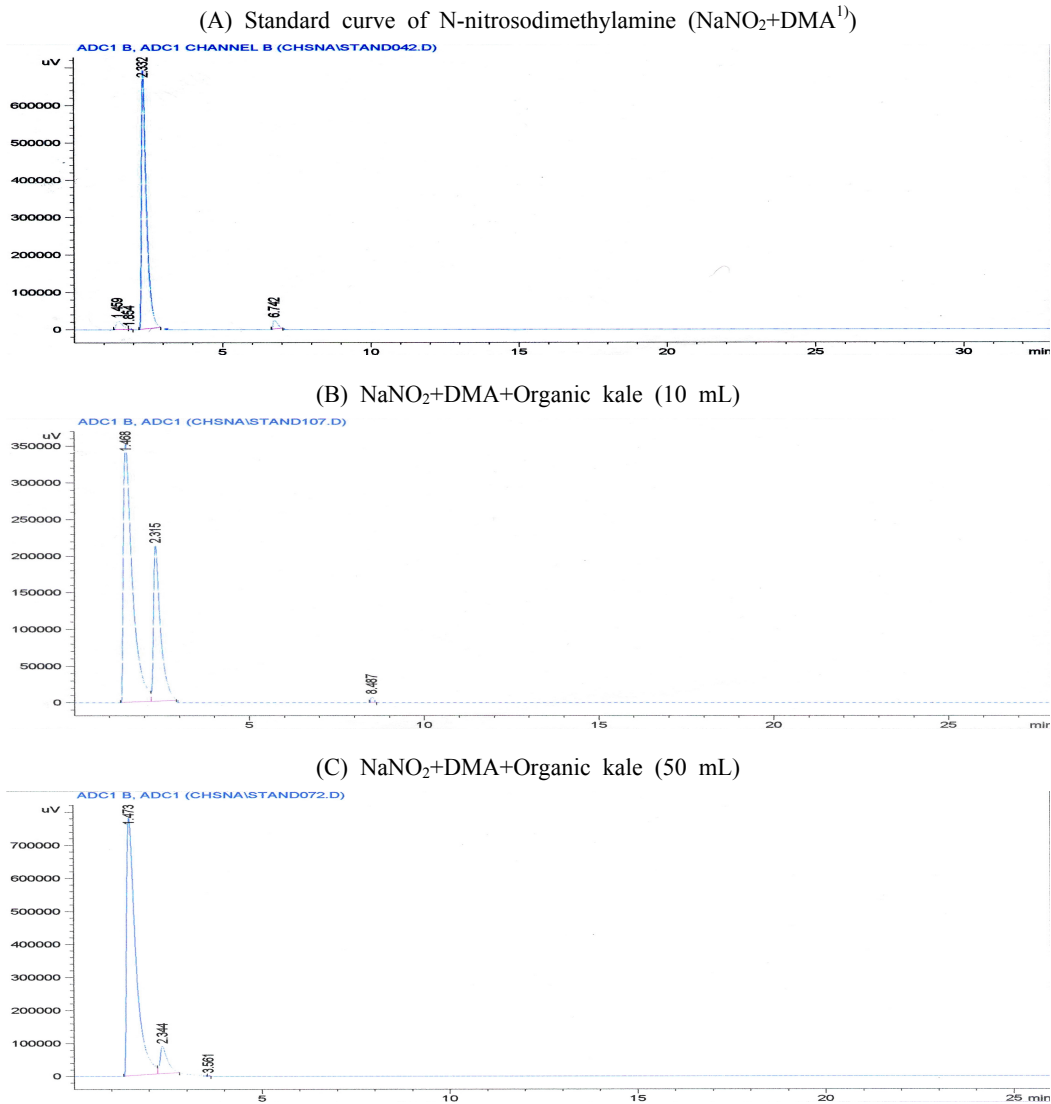
**Table 2.** Inhibition rate (%) of NDMA (N-nitrosodimethylamine) formation by organic juices under simulated human gastric condition

Sample	NDMA inhibition rate (%)
Control	0
Organic kale	64.0
	85.9
Organic <i>A. keiskei</i>	68.9
	76.2

(Table 2, Fig. 4). 100 mM NaNO<sub>2</sub>의 nitrite 함량은 7.1 mg/mL를 뜻하며 유기농 케일 채소즙의 경우 51.4 µg/mL로 138배 차이가 나므로 유기농 케일 채소즙이 2차 아민과 반응했을 때 NDMA가 생성되지 않을 것으로 추정되며, 오히려 케일 채소즙 내에 있는 비타민 C 등의 식물 화합물이 위 내에서 니트로사민의 생성과정을 억제하는 것으로 나타났다. 유기농 신선초 채소즙 10 mL를 첨가한 경우 NDMA 생성 억제율은 68.9%로 나타났고 50 mL를 첨가한 경우 76.2%로 나타났다(Table 2, Fig. 5). 100 mM NaNO<sub>2</sub>의 nitrite 함량은 7.1 mg/mL를 뜻하며 유기농 신선초 채소즙의 경우 39.9 µg/mL로 177배 차이가 나므로 유기농 신선초 채소즙이 2차 아민과 반응했을 때 NDMA가 생성되지 않을 것으로 추정된다. 이 실험 결과는 유기농 케일 채소즙과도 비슷한 경향을 보였는데 앞서와 같이 유기농 신선초 채소즙은 채소즙 내 여러 식물화합물의 작용으로 니트로사민의 생성과정을 오히려 억제하는 것으로 나타났다. 니트로사민 생성 최적 pH는 2.5~3.0으로 위장의 pH 범위와 유사한 반면 대부분 식품의 pH는 이보다 높다. 이렇게 식품 내에서 발생하는 니트로사민 생성 반응은 nitrite와 반응할 수 있는 화합물에 의해 억제될 수 있다. 비타민 C, α-tocopherol, sulfur dioxide, total phenol compounds 등에 의해 니트로사민의 생성은 억제된다(18,37). 이들은 nitrosating agent를 빠르게 파괴하거나 반응성 없는 물질로 환원시켜 니트로사민 생성을 감소 또는 최소화시키거나 완전히 방지한다. 이들은 니트로사민 생성의 기질인 아민과 경쟁적으로 작용하며 생성 억제 정도는 상호 간의 농도 및 pH에 의해 영향을 받는다. 특히 녹황색 채소는 비타민 C를 비롯하여 α-tocopherol, phenolic 화합물을 섭취할 수 있는 주요 급원이므로 최근에 많은 연구결과 채소추출물이 니트로사민 형성을 억제함을 알 수 있었다(38,39). 즉 채소즙에 질산염이 다량 존재함에도 불구하고 위장관에서 니트로사민이 생성되기보다는 오히려 억제하는 효과를 보임으로써 채소즙은 발암물질인 니트로사민 생성과 관련하여 안전한 식품이라 할 수 있다.

**채소즙의 항돌연변이 효과**

박테리아의 변이주를 이용한 돌연변이물질의 검출방법은 1975년 Ames 등에 의해 개발되었으며, Ames 실험계는 신뢰성, 경제성 및 간편성 때문에 지금까지도 세계적으로 가장



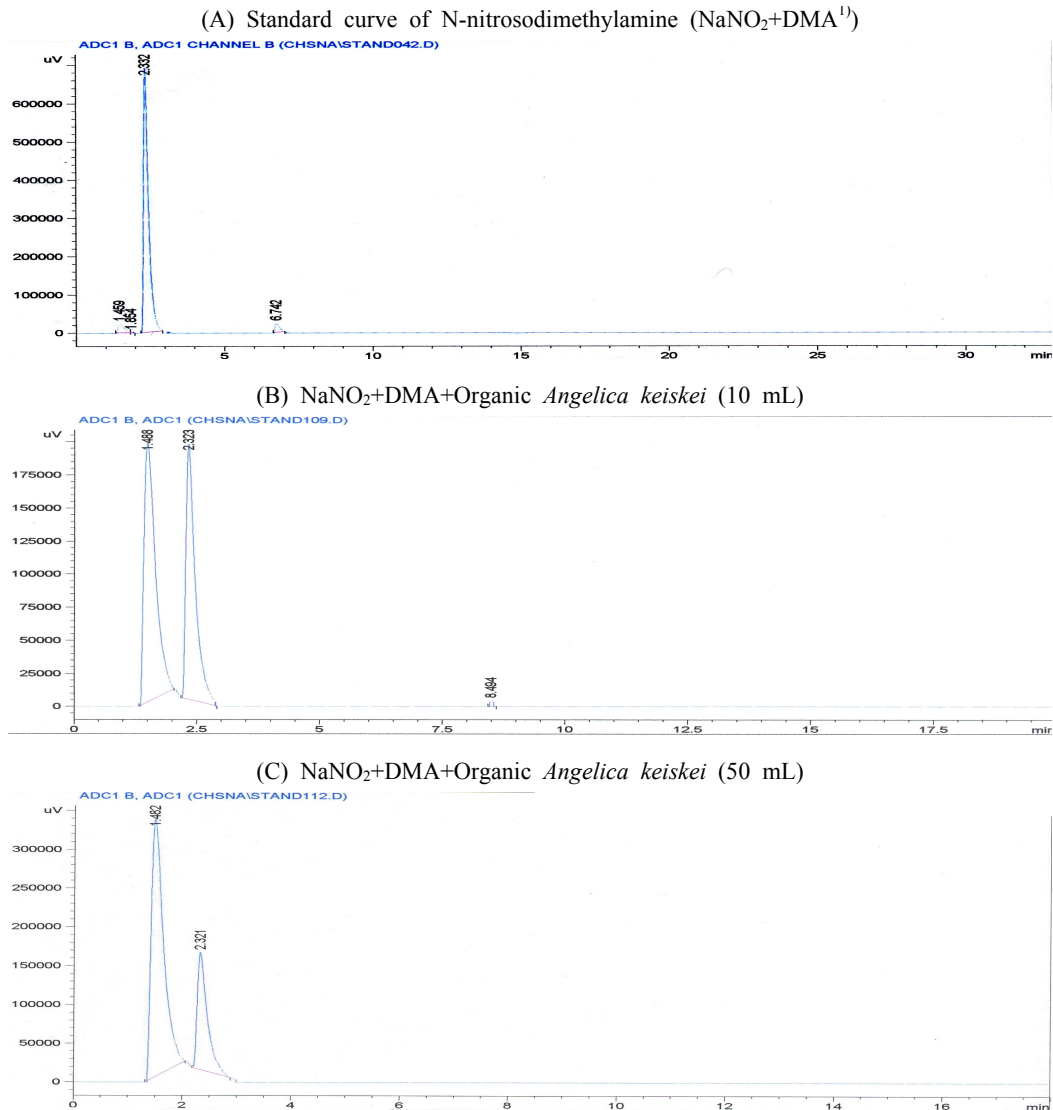
**Fig. 4.** GC-TEA of NDMA (N-nitrosodimethylamine) chromatograms in organic kale juice under simulated gastric condition. <sup>1</sup>)DMA, dimethylamine.

널리 이용되는 세균을 이용한 *in vitro* 돌연변이 유발(발암) 실험계이다(40). Ames 실험계는 *Salmonella* Typhimurium 을 돌연변이 시킨 histidine 요구성 균주인 *S. Typhimurium* TA98과 *S. Typhimurium* TA100 등을 이용하는데, 균주에 돌연변이물질을 노출시킨 다음 minimal glucose agar plate에 형성된 his<sup>+</sup> 복귀 돌연변이의 colony 수를 계수하여 돌연변이 및 항돌연변이성의 유무를 판정한다(41). 니트로사민 생성에 안정했던 채소즙이 기존에 알려진 바와 같이 항돌연변이 활성이 있는지 Ames test 방법을 이용해 연구하였다. 일반농 및 유기농 채소즙이 항돌연변이 효과가 있는지를 살펴보기 위해서 신선한 채소즙을 4°C, 9,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 4°C에서 4일 교반하여 투석(Mw 12,000, cellulose tubing, Sigma-Aldrich Co.)한 다음 투석막 내의 물질을 동결건조 후 멸균증류수에 용해시켜 사용하였다. 일반농 및 유기농 케일의 항돌연변이

**Table 3.** The effect of the filtered fresh juice of common and organic kale on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG, 0.4 µg/plate) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment	Revertants/plate	Inhibition (%)	
Spontaneous	50 µL	114±10	—
	100 µL	98±20	—
MNNG (control)	50 µL	440±68	—
	100 µL	881±66	—
MNNG+CK <sup>1)</sup>	50 µL	438±68	1
	100 µL	840±80	5
MNNG+OK <sup>2)</sup>	50 µL	418±20	7
	100 µL	446±17*	56

\*Significant differences were compared with MNNG alone control at P<0.05.  
<sup>1</sup>)CK, common kale. <sup>2</sup>)OK, organic kale.



**Fig. 5.** GC-TEA of NDMA (N-nitrosodimethylamine) chromatograms in organic *Angelica keiskei* juice under simulated gastric condition. <sup>1</sup>DMA, dimethylamine.

효과를 검토한 결과는 Table 3과 같다. 각 군주에 대하여 채소즙 시료들이 독성을 나타내지 않는 범위에서 100 µL의 농도에서는 일반농 케일은 5%의 억제율을 보인 반면 유기농 케일은 56%의 억제율을 보여 유기농 케일이 일반농에 비해 항돌연변이 효과가 더 높음을 알 수 있었다. MNNG의 돌연변이 유발성을 일반농 및 유기농 신선초 채소즙이 억제하는지를 살펴본 결과, 100 µL의 농도에서는 일반농 신선초는 19%의 억제 효과를 보인 반면 유기농 신선초는 64%의 억제 효과를 보여 유기농 신선초가 일반농에 비해 항돌연변이 효과가 높음을 알 수 있었다(Table 4). 신선초 채소즙도 케일 채소즙과 마찬가지로 농도 의존적으로 MNNG의 돌연변이 유발성을 억제하는 효과를 보여 NO<sub>2</sub> 및 니트로사민에 대한 안전성이 있을 뿐 아니라 케일 및 신선초 채소즙 자체가 돌연변이 유발을 억제하는 효과가 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

**Table 4.** The effect of the filtered fresh juice of common and organic *Angelica keiskei* on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG, 0.4 µg/plate) in *Salmonella* Typhimurium TA100

Treatment	Revertants/plate	Inhibition (%)	
Spontaneous	100 µL	92.5±1	
	200 µL	94.5±8	
MNNG (control)	100 µL	881±66	
	200 µL	1,173±120	
MNNG+CAK <sup>1)</sup>	100 µL	732±371	19
	200 µL	531±10*	60
MNNG+OAK <sup>2)</sup>	100 µL	380±20*	64
	200 µL	298±93*	81

\*Significant differences were compared with MNNG alone control at P<0.05.

<sup>1)</sup>CAK, common *Angelica keiskei*.

<sup>2)</sup>OAK, organic *Angelica keiskei*.

지금까지 녹황색 채소를 이용해 제조한 채소즙의 건강기능성에 대한 상당한 연구가 있어왔는데 주로  $\beta$ -carotene, 비타민 C를 위주로 한 항산화 기능성 물질의 함량 분석, DNA 손상 보호 효과, 암세포 성장 저해 효과, 혈청지질 개선 효과 등이 보고되었다(42,43). 한편 녹황색 채소는  $\text{NO}_3$ 을 많이 함유하고 있으며, 이러한 질산염을 많이 섭취할 경우 체내에서  $\text{NO}_2$ 로 환원되어 식품에서 섭취된 2급 아민류와 결합해 니트로사민이라는 발암물질을 만들 수 있다. 이로써 오히려 암을 일으킬 수 있는 물질을 함유할 가능성이 있기 때문에 안전성 논란이 있었다. 본 연구에서는 현재 국내에서 가장 대표적으로 소비되고 있는 채소즙 중 일반농과 유기농 케일 및 신선초 채소즙을 선택하여 생채소 그 자체를 사용하는 채소즙의 특성상 안전성 연구를 위하여 인공소화 시 채소즙의  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  및 니트로사민의 함량을 측정하였다. 그리고 채소즙이 위에서 인공소화 시  $\text{NO}_3$  및  $\text{NO}_2$ 의 변화와 NDMA 생성 억제능을 측정하고, Ames test를 통해 돌연변이 유발 억제 효과를 측정하여 유기농 채소즙의 안전성을 규명하고자 하였다. 케일(*Brassica oleracea*)은 암 예방 효과가 좋다고 알려진 십자화과 채소들 중의 하나로써 우리나라에는 도입된 지는 얼마 되지 않으나 녹즙과 쌈용으로 꾸준히 애용되고 있으며, 플라보노이드, 클로로필, 섬유소, 비타민 C,  $\beta$ -carotene, benzyl isothiocyanate와 phenylethyl isothiocyanate 등을 많이 함유하고 있어 항산화, 항돌연변이 및 항암 효과가 기대되고 있다(44). 케일 주스와 케일의 메탄올추출물, 클로로필린이 *in vivo* 상에서 항돌연변이 및 항암 효과가 현저히 높은 것으로 밝혀졌으며, Lee 등(45)은 케일 주스, 메탄올추출물 그리고 클로로필린은 sarcoma 180 *in vivo* 실험에서 항암 효과를 나타내었고, 식균 작용 및 NBT 환원능의 증가로 면역 활성화에 영향을 끼치므로 암 예방에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. 케일의 수용성 식이섬유가 항돌연변이 작용이 있음을 발표되었으며(46), 케일에 풍부한 chlorophyll은 *in vivo*에서 대부분(95%)이 흡수되지 않고  $\text{Mg}^{2+}$ 가 위산에 의해 제거되어 protoporphyrin을 형성하고, 또한 phytyl ester도 부분적으로 소화효소에 의해 제거되어 나머지는 pheophytin이 분뇨로 배출된다고 밝혀졌으며, monogastric 포유동물 소화시스템에 의해 발생하는 화학적 변화가 chlorophyll을 chlorophyllin(클로로필의 수용성 유도체)과 비슷한 분자로 변화시켰으며, 이것은 소화과정이 섭취된 클로로필을 활성화하여 돌연변이 저해제로 활성화하는데 역할을 하는 것으로 알려져 있다(47). 신선초(*Angelica keiskei* Koidz)는 아열대지방에서 자생하는 미나리과에 속하는 다년생 초본으로 비타민, 무기질, 식이섬유질이 풍부할 뿐 아니라 생리활성 물질인 각종 flavonoid, coumarin, saponin 등이 들어있어 자연 건강식품으로 주목받고 있는 채소류이다. 신선초 녹즙에 관한 연구는 주로 영양성분에 관한 것이 보고되었으며 최근 생리학적 기능에 관한 것이 보고되고 있다. 신선초 녹즙의 간 손상 방지 효과 및 지질대사 개선 효과에 관한 연구가 보고되었다

(48). Park과 Kim(49)은 온도별 저장의 차이와 착즙 즉시에 비해 24, 48, 72시간 후의 신선초 생즙의  $\beta$ -carotene과 비타민 C의 함량 및 항산화능을 측정하였으며, 착즙 후 시간의 경과에 항산화 비타민의 파괴율이 증가됨을 보고한 바가 있다. 본 연구에서는 일반농 및 유기농 케일, 신선초 채소즙의 인공위액에서의 소화과정 중 질산염과 아질산염 함량을 분석한 결과 유기농 및 일반농 채소즙의 질산염 함량은 인공소화 전보다 후의 함량이 낮아졌고 발암성 NDMA가 채소즙의 소화과정 중에서 감소하는 것을 발견하였다. 또한 채소즙의 돌연변이 유발 및 저해 효과를 살펴본 결과 항돌연변이 활성이 있어 케일 및 신선초 채소즙의 안전성을 본 연구를 통해 밝힐 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 유기농 및 일반농 케일과 신선초를 착즙하여 다양한 실험을 통하여 안전성 및 항돌연변이 활성을 비교하였다. 유기농 채소즙의 안전성 측정을 위해 질산염과 아질산염 함량을 분석한 결과 케일즙의 경우 유기농 및 일반농의 함량이 유사하게 나타났다. 신선초즙의 경우 유기농이 일반농보다 질산염 및 아질산염 함량 모두 유의적으로 낮게 나타났다. 한편 7종류의 니트로사민 모두가 이들 채소즙에서 검출되지 않았다. 니트로사민의 저해물들이 반응하는 위에서의 변화를 알아보기 위하여 인공위액에서의 소화과정 중 질산염과 아질산염 함량을 분석한 결과, 유기농 및 일반농 채소즙의 질산염 함량은 인공소화 전보다 후의 함량이 현저히 낮아졌다. 인공 위액계에서 채소즙은 아질산염과 2급 아민에 의해 생성되는 니트로사민의 생성을 오히려 크게 억제하는 효과가 있었다. 질산염과 아질산염을 함유하고 있는 채소즙의 돌연변이 유발 및 저해 효과를 살펴보기 위해 Ames test를 한 결과 항돌연변이 활성이 있었으며, 유기농 채소즙의 항돌연변이 효과가 일반농에 비해 우수한 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과 채소즙의 주재료가 되는 유기농 케일 및 신선초는 질산염, 아질산염 등의 함량이 낮을 뿐만 아니라 소화과정에서 전환되어 니트로사민을 생성하지 않았고 항돌연변이 효과도 우수한 것으로 나타났다.

## REFERENCES

- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. 1995. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 7-20.
- Bhardwaj RL, Pandey S. 2011. Juice blends—a way of utilization of under-utilized fruits, vegetables, and spices: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51: 563-570.
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S-2085S.
- Riccioni G, D'Orazio N, Salvatore C, Franceschelli S, Pesce M, Speranza L. 2012. Carotenoids and vitamins C and E in the prevention of cardiovascular disease. *Int J Vitam Nutr Res* 82: 15-26.



5. Zhang J, Hou X, Ahmad H, Zhang H, Zhang L, Wang T. 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem* 145: 57-65.
6. Arroqui C, Rumsey TR, Lopez A, Virseda P. 2001. Effect of different soluble solids in the water on the ascorbic acid losses during water blanching of potato tissue. *J Food Eng* 47: 123-126.
7. Howard LA, Wong AD, Perry AK, Klein BP. 1999.  $\beta$ -Carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *J Food Sci* 64: 929-936.
8. White JW Jr. 1975. Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J Agric Food Chem* 23: 886-891.
9. Gangolli SD, van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJ, Spiegelhalter B, Walker R, Wisnok JS. 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur J Pharmacol* 292: 1-38.
10. Shumilova TE, Nozdrachev AD, Vaĩnshteĩn GB, Semernia VN, Shereshkov VI, Ianvareva IN, Panov AA. 2006. Oxygen consumption in rat brain tissues in conditions of acute nitrite methemoglobinemia. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 42: 63-67.
11. Avasilcãĩ L, Cuciureanu R. 2011. Nitrates and nitrites in meat products – nitrosamines precursors. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 115: 606-611.
12. Sen NP, Smith DC, Schwinghamer L. 1969. Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Food Cosmet Toxicol* 7: 301-307.
13. Chow CK, Hong CB. 2002. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology* 180: 195-207.
14. Hecht SS. 1997. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 181-191.
15. Chung MJ, Lee SJ, Choi SY, Sung NJ. 2003. Screening of effective components from kale to inhibit N-nitrosodimethylamine formation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 223-229.
16. Lee SY, Munerol B, Pollard S, Youdim KA, Pannala AS, Kuhnle GG, Debnam ES, Rice-Evans C, Spencer JP. 2006. The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. *Free Radic Biol Med* 40: 323-334.
17. Cappellani A, Zanghi A, Di Vita M, Cavallaro A, Piccolo G, Veroux P, Lo Menzo E, Cavallaro V, de Paoli P, Veroux M, Berretta M. 2013. Strong correlation between diet and development of colorectal cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18: 190-198.
18. Lin Q, Shen J, Ning Y, Shen S, Das UN. 2013. Inhibitory effects of water caltrop pericarps on the growth of human gastric cancer cells in vitro. *Curr Pharm Des* 19: 7473-7478.
19. Zinov'eva VN, Spasov AA. 2012. Mechanisms of plant polyphenols anti-cancer effects. I. Blockade of carcinogenesis initiation. *Biomed Khim* 58: 160-175.
20. Kurechi T, Kikugawa K, Fukuda S. 1980. Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation. *J Agric Food Chem* 28: 1265-1269.
21. Raikos N, Fytianos K, Samara C, Samanidou V. 1988. Comparative study of different techniques for nitrate determination in environmental water samples. *Fresenius Z Anal Chem* 331: 495-498.
22. Yu SY, Lee YJ, Song HS, Hong HD, Lim JH, Choi HS, Lee BY, Kang SN, Lee OH. 2012. Antioxidant effects and nitrite scavenging ability of extract from *Acanthopanax cortex* shoot. *Korean J Food & Nutr* 25: 793-799.
23. Hotchkiss JH, Barbour JF, Scanlan RA. 1980. Analysis of malted barley for N-nitrosodimethylamine. *J Agric Food Chem* 28: 678-680.
24. Sung NJ, Klausner KA, Hotchkiss JH. 1991. Influence of nitrate, ascorbic acid, and nitrate reductase microorganisms on N-nitrosamine formation during Korean-style soysauce fermentation. *Food Addit Contam* 8: 291-298.
25. Mao Y, McClements DJ. 2012. Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions. *Food Funct* 3: 1025-1034.
26. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
27. Walker R. 1975. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *J Sci Food Agric* 26: 1735-1742.
28. Park YS. 1998. Nitrate content and organophosphorus pesticide residues in edible part of organic farming vegetables. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 471-476.
29. Walker R. 1996. The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochem Soc Trans* 24: 780-785.
30. Sutandyo N. 2010. Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones* 42: 36-42.
31. Anderson LM, Beebe LE, Fox SD, Issaq HJ, Kovatch RM. 1991. Promotion of mouse lung tumors by bioaccumulated polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Exp Lung Res* 17: 455-471.
32. Cooney RV, Ross PD. 1987. N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution: effects of vanillin and related phenols. *J Agric Food Chem* 35: 789-793.
33. Pignatelli B, Bereziat JC, Descotes G, Bartsch H. 1982. Catalysis of nitrosation *in vitro* and *in vivo* in rats by catechin and resorcinol and inhibition by chlorogenic acid. *Carcinogenesis* 3: 1045-1049.
34. Walker R. 1990. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam* 7: 717-768.
35. Lee SJ, Chung MJ, Shin JH, Sung NJ. 2000. Effect of natural plant components on the nitrite-scavenging. *J Fd Hyg Safety* 15: 88-94.
36. Tannenbaum SR, Wishnok JS, Leaf CD. 1991. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 53: 247S-250S.
37. Walker EA, Pignatelli B, Friesen M. 1982. The role of phenols in catalysis of nitrosamine formation. *J Sci Food Agric* 33: 81-88.
38. Chung FL, Morse MA, Eklind KI, Xu Y. 1993. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis by compounds derived from cruciferous vegetables and green tea. *Ann NY Acad Sci* 686: 186-201.
39. Kuenzig W, Chau J, Norkus E, Holowaschenko H, Newmark H, Mergens W, Conney AH. 1984. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* 5: 309-313.
40. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. 1975. Detection of carcinogenesis as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 5135-5139.
41. Ames BN. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204: 587-593.
42. Chung SY, Kim HW, Yoon S. 1999. Analysis of antioxidant nutrients in green yellow vegetable juice. *Korean J Food Sci Technol* 31: 880-886.
43. Jeon EJ, Kim JS, Park YK, Kim TS, Kang MH. 2003.

- Protective effect of yellow-green vegetables juices on DNA damage in Chinese hamster lung cell using comet assay. *Korean J Nutr* 36: 24-31.
44. Ahluwalia KS, Roy SK, Chatterjee SS, Swarup V. 1979. Kale—a nutritionally rich vegetable. *Indian Horticulture* 24: 9-10.
45. Lee SM, Kim KH, Rhee SH, Park KY. 2000. Antitumorigenic and immunologic effects of kale extracts and chlorophyllin on sarcoma 180 cell-transplanted mice. *J Cancer Prev* 5: 31-38.
46. Lee SM, Rhee SH, Park KY. 1993. Antimutagenic effect of soluble dietary fibers from kale and soybean. *Environ Mutagen Carcinog* 13: 26-35.
47. Olvera O, Zimmering S, Arceo C, Cruces M. 1993. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium (VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res* 301: 201-204.
48. Okuyama T, Takata M, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, Nishino A, Nishino H, Iwashima A. 1991. Anti-tumor-promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Med* 57: 242-246.
49. Park WB, Kim DS. 1995. Changes of contents of  $\beta$ -carotene and vitamin C and antioxidative activities of juice of *Angelica keiskei* Koidz stored at different conditions. *Korean J Food Sci Technol* 27: 375-379.