

재래종 황색자두효소 갈변반응 생성물의 돌연변이 억제작용

함승시

강원대학교 식품공학과
(1987년 2월 6일 수리)

Desmutagenicity of the Enzymatic Browning Reaction Products
Which Obtained from *Prunus salicina* (yellow) Enzyme and
Polyphenol Compounds

Seung Shi Ham

Deptartment of Food Science and Technology, Kangweon National Univ. Chuncheon, Korea

Abstract

The mutagenicity and desmutagenicity on enzymatic browning reaction products which obtained from *prunus salicina* (yellow) enzyme and polyphenol compounds were carried out. In the rec-assay on *Bacillus subtilis* strains H17 and M45, the enzymatic browning reacion products of pyrogallol, hydroxyhydroquinone, 3, 4-dihydroxytoluene and catechol of 10^{-2} M did not showed mutagenicity. In the effects of various metal ions on the rec-assay, the enzymatic browning reaction products of pyrogallool showed mutagenic activity by Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} and Al^{3+} . In the enzymatic browning reaction products of hydroxyhydroquinone, Cu^{2+} , Mn^{2+} and Pb^{2+} were effected in mutagenic action and the enzymatic browning reaction products of catechol was effected in mutagenic action by Mn^{2+} . In the DNA-breaking action of enzymatic browning reaction products of pyrogallol, hydroxyhydroquinone, 3, 4-dihydroxytoluene and catechol did not show DNA-breaking action. In the effects of various metal ions on the DNA-breaking action of enzymatic browning reaction products, Cu^{2+} showed DNA-breaking action. In the mutagenicity test on *Sal. typhimurium* strains TA98 and TA 100 with S-9 mix, 4 kinds of browned substances did not show mutagenicity, all the browned substances showed strong desmutagenic activity in the presence of benzo (α)-pyrene with S-9 mix.

서 론

홍차 커피 담배 등을 제외한 대부분의 식품가공 또는 식품저장증에 일어나는 갈색화반응에 의한 칙색은 식품의 맛과 영양가를 떨어뜨릴뿐만 아니라 제품의 품질을 저하시키기 때문에 상품적 가치 면에서 볼 때 이를 방지하는 것이 대단히 중요하다. 따라서 갈색화 반응에 의한 갈변물질들에 대

한 많은 연구가 행하여져 왔다¹⁻⁸⁾. 한편 비효소적 갈변물질들에 대해서는 돌연변이원성 연구결과 많은 변이원성 물질들이 밝혀졌다. 특히 단백질이나 포도당 그리고 지질의 가열에 의해 생성되는 가열 분해물 가운데는 발암물질이 생성된다는 사실이 밝혀졌다⁹⁾. 한편 최근에는 갈변물질 가운데는 변이원 억제작용이 있음이 보고되었다¹⁰⁾.

그러나 효소작용에 의해 생성되는 갈변반응 생성물의 변이원성에 관한 연구는 아직 깊이 연구된

이 논문은 1986년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

바 없다. 따라서 본 실험에서는 우리나라 재래종 황색계 자두(*Prunus salicina* var. *columnalis*)로부터 polyphenol 산화효소를 추출하여 10^{-2} M 용액의 pyrogallol, catechol, 3, 4-dihydroxytoluene, 그리고 hydroxyhydroquinone 등의 기질과 반응시켜 얻어진 효소적 갈변반응 생성물들에 대해 *Bacillus subtilis* H17 및 M45의 두 균주를 이용한 rec-assay와 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 두 균주를 이용한 Ames test 그리고 calf thymus DNA를 이용한 DNA 절단 실험을 행하여 이들 갈변반응 생성물들의 변이원성 유무를 확인하고 최종적으로 발암물질인 benzo(α)pyrene에 대한 갈변반응 생성물들의 돌연변이 억제 효과를 규명하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 자두는 재래종 황색계 자두를 시중에서 구입하여 물로 씻은 다음 4°C에서 하루 저장하여 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 효소표준의 조제

효소표준은 大村等¹¹⁾의 방법에 의해 시중에서 구입한 자두를 정선하여 물로 씻은 다음 4°C 냉장고에서 하루동안 방치한 다음 세척하여 미리 준비한 찬 acetone 용액에 넣었다. 이것을 acetone과 함께 3000 rpm으로 homogenization하여 다시 찬 acetone용액에 넣은 후 흡인여과하였다. 잔사를 찬 acetone용액으로 수회 세척한 다음 최종적으로 diethyl ether로 세척하고 얻어진 백색의 분말을 냉동실에 보존하면서 실험에 사용하였다.

2) 조효소액의 조제

acetone 분말 0.5 g를 상법¹²⁾에 따라 McIlvane 원총용액(pH 6.0) 40ml로 막자사발증에서 마쇄 추출하여 흡인여과후 여액을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상동액을 효소액으로 사용하였다.

3) 갈변반응 생성물의 조제

갈변반응 생성물의 조제는 鈴田等¹³⁾의 방법에 따라 조제하였으며 기질로서는 pyrogallol, catechol, 3, 4-dihydroxytoluene, hydroxyhydroquinone의 10^{-2} M 용액을 조제하였다. 얻어진 효소적 갈변반응액을 visking tube에 넣어 4°C 중류수 중에서 48시간 투석하였다. 투석막위에 arabic gum을 뿌려 탈수시킨 다음 -80°C에서 동결시켜 동결건조

하였다. 얻어진 갈변반응 생성물의 농도는 10 mg/ml로 조제하여 실험에 사용하였다.

4) Spore rec-assay

Spore의 조제는 Kada 등¹⁴⁾의 방법에 준하여 *Bacillus subtilis* H17(rec⁺) 및 M45(rec⁻) 두 균주의 포자를 조제하였으며 1 l의 nutrient 한천배지를 2 분 조제하여 50°C로 냉각시켜 1 l당 10 ml의 H17 및 M45 포자를 각각 가하여 잘 혼합한 후 petri dish 내에 10 ml씩 분주하였다. H17 및 M45 한천배지를 각각 고화시킨 배지위에 직경 8 mm 와 두께 1.2 mm의 paper disc를 올려놓고 시료용액을 60 µl 씩 가하였다. 이것을 37°C에서 20시간 배양한 후 paper disc 주위에 생성된 생육저지대의 직경을 측정하였다. 양성대조구로는 4-nitroquinone-1-oxide(4-NQO)를 사용하였다.

5) DNA 절단능의 검정

Thomas 등¹⁵⁾의 방법에 의해 실험하였다. calf thymus DNA를 25 mM Na₂PO₄-12.5 mM Na₂HPO₄ 원총용액(pH 6.6)에 용해하여 각시료 20 µl와 DNA 용액(500 µg/ml) 20 µl 및 25 mM의 8가지 금속이온 용액 10 µl의 각 혼합액을 만들고 대조구로서는 20 µl의 dimethylsulfoxide(DMSO)와 20 µl의 DNA 용액 및 10 µl의 중류수를 사용하였다. 이들 각 반응 혼합물 50 µl를 37°C로 3시간 반응시키면서 60분마다 반응액을 취하여 10 µl의 0.3% bromophenol blue(BPB)용액과 함께 0.8%의 agarose를 1.0 mM EDTA 18 mM NaCl 용액 및 0.4 mg/ml의 ethidiumbromide를 함유하는 tris acetate 원총용액(pH 6.8)에 용해하여 제작한 slab gel상에 spotting하여 나타나는 각 시료의 spot 유동성을 다음과 같이 전기영동 분석하였다. 전류는 20 mA 및 20 mV로 조정하여 20시간 전기영동을 행하여 중간체와 결합된 DNA ethidium bromide 혼합물을 장파장의 UV lamp 조사하에 red filter를 사용하여 촬영하였다.

6) 돌연변이원성 및 돌연변이 억제작용

Ames의 plate법¹⁶⁾을 개량한 preincubation법에 따라 실험하였으며 S-9 mix의 조제는 Garner등의 방법¹⁷⁾에 따라 조제하였다. 유도물질로는 phenobarbital(BP)과 5, 6-benzoflavone(BF)을 사용하였다. 돌연변이 억제실험에 사용한 변이원 물질로서는 benzo(α)pyrene을 µg/µl의 농도로 조제하여 실험에 사용하였다. 변이원물질의 첨가량은 10 µg로 고정하였으며 시료용액의 농도를 0.5 mg에서 2 mg 까지 첨가하였다. S-9 mix의 첨가량은 300 µl를 가하였다.

Table 1. Effect of various metal ions on the enzymatic browned substance obtained from *Prunus salicina* enzyme and polyphenol compounds

BRP*	Metal ion	Inhibition zone (mm)		Difference	Conclusion
		Rec ⁺	Rec ⁻		
Pyrogallol	None	3	4	1	±
	Cu ²⁺	0	0	0	—
	Fe ²⁺	0	0	0	—
	Fe ³⁺	0	5	5	±
	Pb ²⁺	0	0	0	—
	Mn ²⁺	3	5	2	±
	Zn ²⁺	5	6	1	±
	Ni ²⁺	2	5	3	±
	Al ³⁺	0	3	3	±
Hydroxyhydroquinone	None	0	3	3	±
	Cu ²⁺	0	2	2	±
	Fe ²⁺	0	0	0	—
	Fe ³⁺	0	0	0	—
	Pb ²⁺	0	3	3	±
	Mn ²⁺	4	5	1	±
	Zn ²⁺	3	3	0	—
	Ni ²⁺	3	3	0	—
	Al ³⁺	0	0	0	—
3,4-dihydroxytoluene	None	0	0	0	—
	Cu ²⁺	0	0	0	—
	Fe ²⁺	0	0	0	—
	Fe ³⁺	0	0	0	—
	Pb ²⁺	0	0	0	—
	Mn ²⁺	0	0	0	—
	Zn ²⁺	0	0	0	—
	Ni ²⁺	0	0	0	—
	Al ³⁺	0	0	0	—
Catechol	None	0	0	0	—
	Cu ²⁺	0	0	0	—
	Fe ²⁺	0	0	0	—
	Fe ³⁺	0	0	0	—
	Pb ²⁺	0	0	0	—
	Mn ²⁺	2	3	1	±
	Zn ²⁺	0	0	0	—
	Ni ²⁺	0	0	0	—
	Al ³⁺	0	0	0	—

* Dose of enzymatic browning reaction product is 0.5mg/plate

결과 및 고찰

1. Rec-assay

4종류의 효소적 갈변반응 생성물에 대한 spore rec-assay 결과 표 1과 같이 갈변반응 생성물 자체로서는 pyrogallol과 hydroxyhydroquinone 갈변반응 생성물에서 약한 생육저지대가 인정되었으며 3,4-dihydroxytoluene과 catechol 갈변반응 생성물은 음성이었다. 금속이온의 영향에 있어서는 pyrogallol 갈변반응 생성물에서 Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 및 Al^{3+} 이 약한 영향을 나타냈으며 hydroxyhydroquinone 갈변반응 생성물의 경우는 Cu^{2+} , Pb^{2+} 및 Mn^{2+} 그리고 catechol 갈변반응 생성물에서는 Mn^{2+} 이 DNA 손상에 약한 영향을 나타냈으나 3,4-dihydroxytoluene의 갈변반응 생성물에서는 8가지 금속이온의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 4종류의 효소적 갈변반응 생성물들은 *bacillus subtilis* H17과 M45 두균주의 DNA 손상에 영향을 나타내지 않았다.

금속이온의 공존에서도 갈변반응 생성물의 종류에 따라 각 금속이온의 영향도 다르게 나타났으나 모두 약한 영향을 보였다.

2. DNA 절단작용

4종류의 polyphenol 화합물의 효소적 갈변반응 생성물에 대한 DNA 절단 실험 결과 갈변반응 생성물에 의한 DNA 절단작용은 없었다. 한편 DNA와

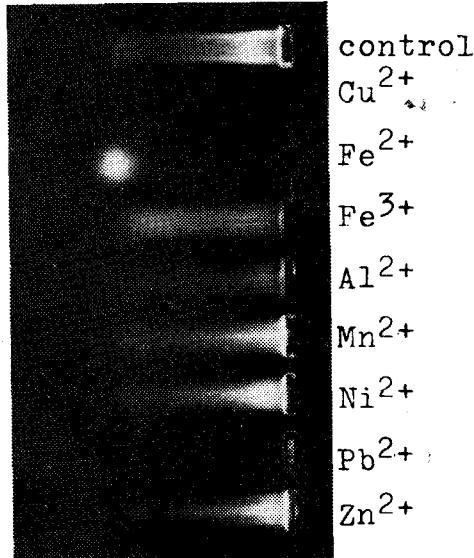


Fig. 1. Effects of DNA-breaking action of various metal ions.

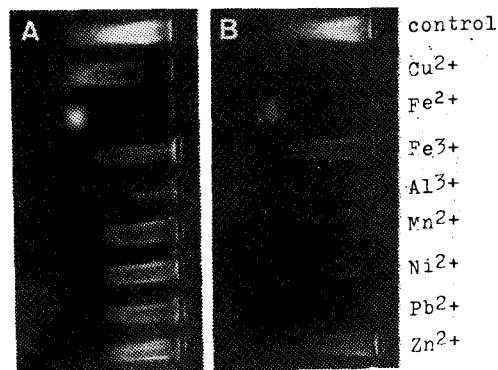


Fig. 2. Effect of various metal ions on the DNA-breaking action of enzymatic browning reaction products.

- (A) Pyrogallol and *Prunus salicina* enzyme
- (B) Hydroxyhydroquinone and *Prunus salicina* enzyme

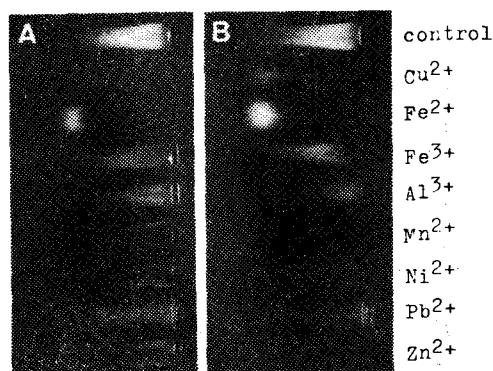


Fig. 3. Effect of various metal ions on the DNA-breaking action of enzymatic browning reaction products.

- (A) 3,4-Dihydroxytoluene and *Prunus salicina* enzyme
- (B) Catechol and *Prunus salicina* enzyme

갈변반응 생성물과의 반응시간을 3시간까지 반응시켰을 경우도 DNA 절단작용은 나타나지 않았다. 그림 1은 DNA 절단에 있어 금속이온의 영향을 알아보기 위해 DNA 용액과 25mM 금속이온의 용액을 10 μ l씩 가한 결과 Fe^{2+} 만이 강한 절단작용을 나타냈으며 나머지 7종류의 금속이온은 DNA 절단에 영향이 없었다.

그림 2와 3은 4종류의 효소적 갈변반응 생성물의 DNA 절단에 있어 금속이온의 영향을 알아본 결

과 Fe^{2+} 의 경우는 그 자체의 결단 능력에 의해 결단되었으며 Cu^{2+} 의 경우는 DNA 결단을 촉진하는 것으로 나타났다. 기타의 금속이온은 DNA 결단에 영향이 없었다.

3. 돌연변이원성 및 돌연변이원 억제작용

효소적 갈변 반응 생성물의 돌연변이원성 유무를 규명하기 위하여 S-9 mix를 첨가한 *sal. typhimurium* TA 100에 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/plate로 투여한 후 48시간 배양한 후 회복률을 측정하였다.

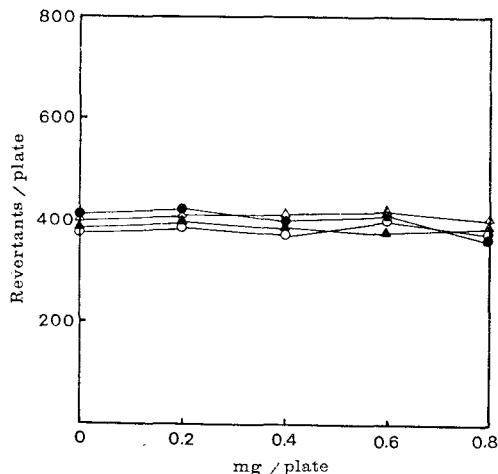


Fig. 4. Mutagenicity of the enzymatic browning reaction products on *Salmonella typhimurium* TA 98 with S-9 mix.

●—● : pyrogallol BRP, ○—○ : hydroxyhydroquinone BRP, ▲—▲ : 3, 4-dihydroxytoluene BRP, △—△ : catechol BRP.

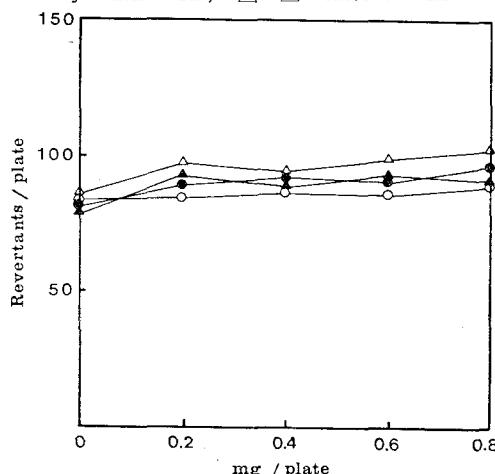


Fig. 5. Mutagenicity of the enzymatic browning reaction products on *Salmonella typhimurium* TA 100 with S-9 mix.

●—● : pyrogallol BRP, ○—○ : hydroxyhydroquinone BRP, ▲—▲ : 3, 4-dihydroxytoluene BRP, △—△ : catechol BRP.

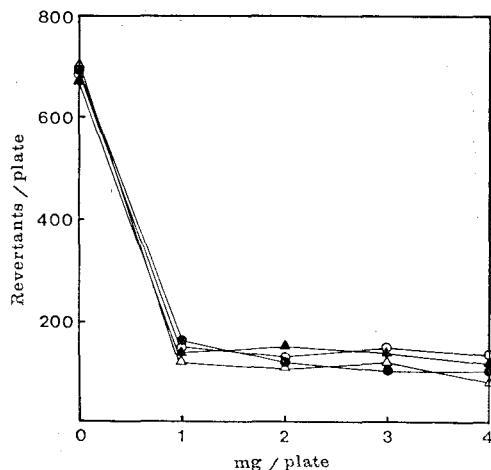


Fig. 6. Desmutagenicity of the enzymatic browning reaction products on *Salmonella typhimurium* TA 100 with S-9 mix.

●—● : pyrogallol BRP, ○—○ : hydroxyhydroquinone BRP, ▲—▲ : 3, 4-dihydroxytoluene BRP, △—△ : catechol BRP.

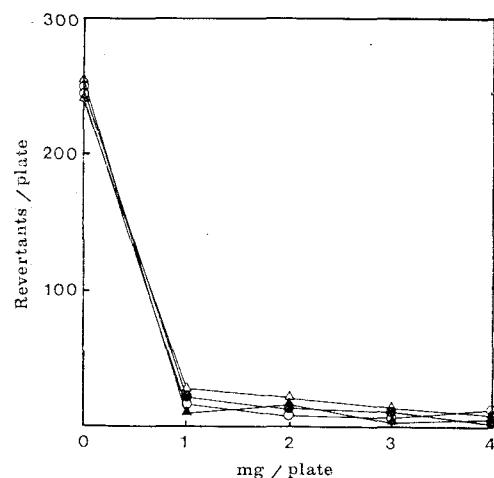


Fig. 7. Desmutagenicity of the enzymatic browning reaction products on *Salmonella typhimurium* TA 98 with S-9 mix.

●—● : pyrogallol BRP, ○—○ : hydroxyhydroquinone BRP, ▲—▲ : 3, 4-dihydroxytoluene BRP, △—△ : catechol BRP.

urium TA98과 TA100 두 균주에 대한 변이원성 실험 결과 그림 4와 5에서 나타난 바와같이 갈변반응 자체에 의한 변이원성은 인정할 수 없었다.

즉 이들 4종류의 효소적 갈변반응 생성물들에 대한 돌연변이원성 실험으로써 rec-assay와 DNA 결단 실험 그리고 Ames test 결과 돌연변이원성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 이들 갈변물질들에

대한 생리적 작용을 밝히기 위하여 발암물질로 알려진 benzo (α) pyrene를 사용하여 돌연변이 억제작용을 알아본 결과 그림 6과 7에 나타난 바와 같이 *sal. typhimurium* TA 98과 TA100, 두 균주에 대해서 갈변물질 1mg 첨가시 benzo (α) pyrene 만을 첨가하였을 때 보다 his^r revertant의 colony 수가 급격히 감소되었으며 농도가 증가함에 따라 colony 수가 점차 감소하는 것으로 나타났다.

金¹⁰이 보고한 바에 의하면 비효소적 갈변반응 생성물인 melanoidine이 benzo (α) pyrene과 같은 발암물질의 작용을 억제한다고 하는 사실과 일치함으로써 효소작용에 의해 생성되는 갈변물질도 melanoidine일 것이라는 지금까지의 연구결과와도 일치된다고 사료된다. 따라서 재래종 자두로부터 추출한 polyphenol 산화효소와 4종류의 polyphenol을 반응시켜 얻어진 효소적 갈변반응 생성물들은 돌연변이원성이 없으며 오히려 돌연변이원 물질의 활성을 크게 저해하므로써 돌연변이 억제작용이 강하게 나타났다.

요 약

재래종 황색계자두 효소와 4종류의 polyphenol 화합물과 반응시켜 얻어진 효소적 갈변반응 생성물에 대하여 변이원성 및 변이원 억제작용에 관한 실험결과 *B. subtilis* H17과 M45 두 균주를 이용한 rec-assay에서 4종류의 갈변반응 생성물 모두 변이원성은 없었다. rec-assay에서 금속이온의 영향을 실험한 결과 pyrogallol의 갈변반응 생성물의 경우 Fe³⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Al³⁺에서 약한 영향을 받았으며 hydroxyhydroquinone의 갈변반응 생성물에서는 Cu²⁺, Pb²⁺, 그리고 catechol의 갈변반응 생성물에서는 Mn²⁺ 공존下에서 약한 영향을 받았다.

DNA절단실험 결과 갈변반응 생성물 자체에 의해서는 4종류의 시료 모두 DNA 절단능력은 없었다. 금속이온의 영향에서는 Fe³⁺의 경우 그 자체에 의해 절단되었으며 Cu²⁺은 DNA 절단을 촉진하는 것으로 나타났다.

S-9 mix를 첨가한 돌연변이 유발실험에서는 4종류의 갈변반응 생성물 모두 농도증가에도 변이원성은 없었으며 변이원 물질인 benzo α pyrene에 대한 돌연변이원 억제작용에서는 4종류의 갈변반응 생성물 모두 농도증가에 따라 대조구에 비해

강한 억제작용을 나타냈다.

따라서 재래종 황색계 자두로부터 추출한 polyphenol oxidase와 4종류의 polyphenol 화합물과 반응시켜 얻어진 효소적 갈변반응 생성물의 돌연변이원성 실험결과 갈변반응 생성물 자체에 의한 돌연변이원성은 없었으며 금속이온의 영향도 받지 않는 것으로 나타났으나 강력한 발암물질인 benzo (α) pyrene을 사용한 돌연변이 억제실험에서는 4종류의 갈변반응 생성물 모두 강한 돌연변이 억제작용이 있음을 알 수 있었다.

문 헌

- 篠原和毅, 福元裕二, 會耀崑, 井上讓, 大村浩久 : 九州大農學誌, 28(9) : 499 (1974).
- 村木弘行, 山崎岩雄, 増田博 : 日本食品工業學會誌, 22(4) (1975).
- 尊田民喜, 井上浩輔, 荒巻輝代, 大村浩久 : 九州大農學誌, 28(2) : 73 (1974).
- 大村浩久, 副枝紘一郎, 山藤一雄 : 學藝雜誌, 22(2) : 109 (1966).
- 尊田民喜, 大村浩久 : 榮養と食糧, 28(3) : 151 (1975).
- 尊田民喜, 荒巻輝代, 大村浩久 : ?
- 大村浩久, 尊田民喜 : 榮養と食糧, 23 (6) : 367 (1970).
- 大村浩久, 尊田民喜, 淺田要一郎, 村中誠, 橋英文 : 日本食品工業學會誌, 22(8) : 355 (1975).
- 長尾美奈子 : 變異原と毒性, 4(5) : 20 (1981).
- 金殷鎬 : 日本 九州大學 博士學位論文(1986).
- 大村浩久, 尊田民喜 : 榮養と食糧, 23 : 367 (1970).
- 大村浩久, 尊田民喜 : 榮養と食糧, 22 : 497 (1969).
- 尊田民喜, 稲稻富良文, 淺田要一良, 吉川秀樹 大村浩久 : 九州大農學誌, 29(3) : 71 (1974).
- Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y.: Mutation Res., 16 : 165 (1972).
- Thomas, M. and Davis, R.: Mol. Biol., 91: 315 (1975).
- Ames, B.N., Cann, J. MaCann. and Yamasaki, E.: Mutation Res., 31 : 347 (1975).
- Garner, R.C., Miller, E.C. and Miller, J.A.: Cancer Res., 32 : 2058 (1972).