

효소적 갈변반응 생성물의 돌연변이 억제효과 및 유전자 수복에 관한 연구

함승시 · 김성완* · 김영명*
강원대학교 식품공학과, *생화학과

Studies on Antimutagenic Effects and Gene Repair of Enzymatic Browning Reaction Products

Seung-Shi Ham, Sung-Wan Kim* and Young-Myung Kim*

Department of Food Science and Technology, Kangweon National University,

*Department of Biochemistry, Kangweon National University

Abstract

The biological activities of twelve different kinds of enzymatic browning reaction products (EBRP), which resulted from the reactants four kinds of polyphenols with polyphenol oxidase extracted from *Ligularia fischeri*, *pimpinella brachycarpa* and *Aster scaber* of edible mountain herbs. All of twelve samples did not show any mutagenic effect in the spore *rec*-assay, Ames mutagenicity test and DNA breaking test. However metal ions such as Cu^{2+} , Fe^{2+} , and Ni^{2+} were increased the DNA breakage in *rec*-assay. The EBRPs inhibited the mutagenicities induced by benzo(α)pyrene(B(α)P), 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido-[4, 3-b]indole(Trp-P-1) and 2-aminofluorene(2-AF) in *Salmonella*/microsome assay system with S-9 mix. In effects of EBRPs on the DNA repair system, the activity of *Eco*RI was highly inhibited and that of T₄ DNA ligase was inactivated by addition of EBRPs. The results of transformation ratio of plasmid pGA658 into *E. coli* HB 101 was significantly decreased by the reaction products of *S. brachycarpa* polyphenoloxidase(PPO). When UV light was exposed to the mixture of DNA and EBRP before the transformation, the reaction products from *L. fischeri* PPO with pyrogallol, catechol and hydroxyhydroquinone stimulated transformation ratio.

Key words : antimutagenicity, enzymatic browning reaction product, gene repair, transformation ratio

서 론

대부분의 과실 또는 채소는 상처를 입거나 절단, 동결 및 병해 등의 장애를 받으면 속도의 차이는 있으나 갈변하며, 과실에 따라서는 지나치게 익으면 갈변하는 것도 있다. 이와 같은 효소적 갈변의 기구에 관해서는 지금까지 많은 연구가 행해져 왔으나 아직도 분명치 못한 점이 많다. 한편, 갈변반응 생성물에 대한 생리적 작용에 대해서도 별로 연구되어진 바 없으며 최근에 들어와서 재래종 황색 또는 적색자두의 효소적 갈변반응 생성물에 대한 항돌연변이원성 연구가 이루어진 바 있으며⁽¹⁾, Kim⁽²⁾은 비효소적 갈변반응 생성물 중에는 변이원 물질의 작용을 억제하는 활성이 있다고 보고 하므로서

효소적이거나 비효소적으로 생성되는 갈변물질의 생리 작용에 대한 연구가 관심을 끌게 되었다.

따라서 본 실험에서는 효소적 갈변반응 생성물들에 대한 돌연변이원성 및 돌연변이 억제작용을 규명하기 위해서 우리나라 산지에 널리 자생하고 있는 곰취와 참취 그리고 참나물로부터 효소를 추출하여 4종류의 polyphenol 화합물과 반응시켜 얻어진 갈변반응 생성물에 대하여 변이원성 유무를 검토하고 최종적으로 변이원 물질의 억제활성을 검토하기 위하여 발암물질인 2-aminofluorene(2-AF), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b) indole(Trp-P-1) 및 benzo(α)pyrene(B(α)P)의 억제 효과를 검토하였다. 한편, 유전자 조작기술에 사용되는 여러 가지 기본 system을 이용하여 갈변반응 생성물질이 세포내에 DNA와의 상호작용, 특히 DNA수복에 관련된 효소계에 미치는 영향을 측정하므로써 발암물질들에 대한 효소적 갈변반응 생성물의 작용을 DNA 수준에서 검토하였다.

Corresponding author : Seung-Shi Ham, Department of Food Science and Technology, Kangweon National University, 192-1, Hoyoja-dong, Chuncheon-shi, 200-701 Kangweon-do, Korea

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 곰취, 참취 및 참나물은 시장에서 구입하여 물로 세척해서 불순물을 제거한 것을 실험에 사용하였다.

갈변반응 생성물의 조제

효소를 추출하기 위한 효소표품의 조제는 大村 등⁽³⁾의 방법에 의해 acetone 분말을 조제하였으며 조효소액의 조제는 acetone 분말 0.5g을 상법⁽⁴⁾에 따라 McIlvane 완충액(pH 6.0) 40 ml로 막자사발 중에서 마쇄 추출하여 흡입여과 후 여액을 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 효소액으로 사용하였다. 갈변반응액의 조제는 藤田 등⁽⁵⁾의 방법에 따라 조제하였으며 기질로서는 pyrogallol(Py), hydroxyhydroquinone(HHQ), catechol(Ca) 및 3,4-dihydroxytoluene의 10⁻² M 용액을 조제하여 갈변반응 시켰다. 얻어진 갈변반응액을 visking tube에 넣어 4°C 증류수 중에서 48시간 투석하였다. 투석 후 투석막 표면에 gum arabic 분말을 뿌려 탈수 시킨 다음 동결건조 하였다. 얻어진 곰취효소 갈변반응 생성물(곰취 EBRP), 참취효소 갈변반응 생성물(참취 EBRP) 및 참나물효소 갈변반응 생성물(참나물 EBRP)의 농도는 10 mg/ml로 조제하여 실험에 사용하였다.

Rec-assay

Bacillus subtilis H17(*rec*⁻)과 M45(*rec*⁻) 두 균주의 포자생성과 *rec*-assay는 Kada 등⁽⁶⁾의 방법에 의하여 실험하였다. 즉 미리 조제해 둔 포자한천 배지위에 직경 8 mm, 두께 1.2 mm의 paper disc을 올려 놓고 시료 용액을 60 µl씩 가하여 37°C로 20시간 배양한 후 paper disc 주위에 생성된 생육저지대의 직경을 측정하여 변이원성의 강도를 판정하였다. 양성대조로서는 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)를 사용하였다.

DNA 절단 작용

DNA의 절단능은 Thomas 등⁽⁷⁾의 방법에 준하여 실험하였으며 모든 실험조건은 전보⁽⁸⁾의 방법에 따라 수행하였다.

돌연변이원성 및 돌연변이 억제작용

Ames의 plate 범⁽⁹⁾을 개량한 preincubation 범⁽¹⁰⁾에 따라 실험하였으며 S-9의 조제는 Garner 등의 방법⁽¹¹⁾에 따라 조제하였다. S-9 조제에 사용한 유도물질로서는 phenobarbital과 5,6-benzoflavone을 사용하였다. 돌연변이 억제 실험에 사용한 발암물질로서는 B(α)P, 2-AF 및

Trp-P-1을 1 µg/µl의 농도로 조제하여 실험에 사용하였다. 변이원물질의 첨가량은 10 µg으로 하였다. S-9 mix의 첨가량은 300 µl였다.

효소적 갈변반응 생성물과 DNA 절단효소 EcoRI 활성과의 관계

pGA658의 분리는 pGA658을 함유하는 *E. coli*를 kanamycin(10 µg/ml)과 tetracyclin(3 µg/ml)을 함유한 Luria broth 배지 500 ml에서 지수기 말기까지 37°C에서 배양한 후 4°C에서 세포를 수집하였다.

이 세포로부터의 pGA658의 분리는 Birnboim과 Doly의 alkaline lysis 방법⁽¹²⁾을 이용하였다. plasmid 4 µl, 갈변반응 생성물 3 µl(2.5 units)를 첨가하여 혼합 후 37°C에서 45분간 항은 반응시켰다. 반응 후 즉시 EDTA를 최종 농도 10 mM이 되도록 첨가하여 반응을 정지시키고 이 반응액에 1/10 부피의 loading 완충액을 첨가하여 0.9% agarose gel상에서 60 voltage로 1.5시간 전기영동으로 분리하여 분리된 pattern을 비교 검토하였다.

효소적 갈변반응 생성물과 T₄ DNA ligase 활성과의 관계

Plasmid 100 µl, 증류수 80 µl와 완충용액 20 µl의 혼합용액에 *Sal* I 5 µl(10 units)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, phenol 용액(phenol : chloroform : isoamyl alcohol=24 : 1)으로 2회 추출하고 다시 chloroform 용액(chloroform : isoamyl alcohol=24 : 1)으로 2회 추출하였다.

이 용액에 2배 부피의 냉각된 95% ethanol을 첨가하여 -20°C에서 20분간 원심분리하여 침전물을 냉각된 70% ethanol로 세척하고 진공 desiccator에서 건조하였다. 침전물을 소량의 TE 완충용액으로 용해하였다. 이 절단된 DNA 용액 20 µl, 갈변생성물 3 µl(0.015 µg과 0.03 µg), 10 mM ATP 1 µl, DTT 1 µl, ligase 완충용액 1 µl의 혼합용액에 ligase 2 µl(400 units)를 첨가하여 10°C에서 24시간 반응시킨 후 1% agarose gel상에서 전기영동하여 ligation에 대한 갈변 생성물의 첨가 효과를 비교 검토하였다.

효소적 갈변 생성물과 DNA 손상과의 관계

분리 정제된 pGA658을 갈변반응 생성물의 존재하에서 UV light에 의하여 DNA에 손상을 준 후 *E. coli* HB 101에 transformation을 실시하여 그 transformation frequency를 비교 검토하였다. 즉, 12종류의 시료를 각각 3 µl(0.06 µg)와 DNA 6 µl를 혼합하여 만들고 그에 대응한 control은 갈변반응 생성물 대신 증류수 3 µl를 혼합하였다. UV light 조사의 조건은 1.04 J/m²sec로서 30

분간 조사한 후 *E. coli* HB 101에 Mandel과 Higa⁽¹³⁾ 방법에 의하여 transformation 시켰다. 즉 상기의 혼합 물에 UV light를 조사한 후 배양된 *E. coli* HB 101 세포를 50 μ 씩 넣고 얼음 위에서 40분간 방치한 후 42°C에서 2분간 가열하였다. LB배지에 250 μ 씩 넣고 37°C의 항온조에서 1시간 배양한 후 petri dish에 plating하였다. 37°C에서 24시간 배양하여 colony수를 세어 control을 100%로 기준하여 다른 colony수를 비교 검토하였다.

결과 및 고찰

Rec-assay

12종류의 EBRP에 대한 rec-assay 결과는 Table 1과 같으며 참취, 곰취 및 참나물 효소에 의한 pyrogallol EBRP과 곰취효소에 의한 catechol EBRP의 경우 약한 DNA 손상을 나타내었으나 그외 모든 시료에서는 변이 원성은 인정되지 않았다. 한편, 금속이온의 영향에서는 시료에 따라 영향이 다르나 일반적으로 Zn^{2+} 의 경우 대부분의 시료에 대하여 DNA 손상을 촉진시켰으며 그외 금속이온들은 극히 약한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Zn^{2+} 이 세포내에서 DNA손상을 촉진시키는 것으로 사료된다. 재래종 적색자두 효소갈변반응 생성물의 rec-assay 결과에서도 pyrogallol, 3,4-dihydroxytoluene, hydroxyhydroquinone 그리고 chlorogenic acid 효소갈변반응 생성물 역시 그 자체로서는 고초균 DNA 손상에는 어떠한 영향을 미치지 못하였고⁽¹¹⁾ 금속이온의 영향에서도 pyrogallol과 3,4-dihydroxytoluene의 갈변반응 생성물은 Zn^{2+} 과 Ni^{2+} 의 첨가로 DNA의 손상에 다소 영향을 미치는 것으로 나타났다⁽⁸⁾.

DNA 절단작용

4종류의 시료 모두 DNA와 반응시간을 3시간까지 반응시켰을 경우 절단 작용은 없었으며 그외 곰취와 참나물 EBRP는 모두 영향이 없었다. 한편, 참취 EBRP의 DNA 절단에 있어서 8가지 금속이온의 영향을 검토한 결과는 Fig. 1과 같으며 Cu^{2+} , Fe^{2+} 과 Ni^{2+} 첨가시 DNA 절단을 촉진시키는 것으로 나타났다. 곰취 EBRP와 참나물 EBRP에서는 pyrogallol이나 3,4-dihydroxytoluene EBRP의 경우 Cu^{2+} 의 공존하에서 약한 DNA 절단이 인정되었다. Fe^{2+} 에 의해서는 Fe^{2+} 단독일 때보다 다소 절단을 억제하는 결과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 갈변반응 물질이 손상받은 DNA를 수복시키는 작용을 증가시켜 주는 것으로 사료된다.

항돌연변이원성

공시된 12종류의 EBRP는 *Salmonella typhimurium*

Table 1. Mutagenic effects of enzymatic browning reaction products (EBRP) in addition of various metal ions by the spore rec-assay

Metal ions	Enzymatic browning reaction products (EBRP) ^{a)}											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
None	±	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-
Cu^{2+}	±	±	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-
Fe^{2+}	±	±	±	-	-	-	±	±	-	-	±	-
Fe^{3+}	±	±	±	-	-	-	±	±	-	-	±	-
Pb^{2+}	±	±	±	±	-	-	±	±	-	-	±	-
Mn^{2+}	±	±	±	±	±	-	±	±	-	-	-	-
Zn^{2+}	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-
Ni^{2+}	±	-	±	-	±	-	±	±	-	±	±	-
Al^{3+}	±	±	-	-	-	-	±	±	-	-	±	-

a) 1. *A. scaber* ppo* + pyrogallol, 2. *L. fischeri* ppo + pyrogallol, 3. *S. brachycarpa* ppo + pyrogallol, 4. *A. scaber* ppo + hydroxyhydroquinone, 5. *L. fischeri* ppo + hydroxyhydroquinone, 6. *S. brachycarpa* ppo + hydroxyhydroquinone, 7. *A. scaber* ppo + 3,4-dihydroxytoluene, 8. *L. fischeri* ppo + 3,4-dihydroxytoluene, 9. *S. brachycarpa* ppo + 3,4-dihydroxytoluene, 10. *A. scaber* ppo + catechol, 11. *L. fischeri* ppo + catechol, 12. *S. brachycarpa* ppo + catechol
*ppo : polyphenoloxidase

TA98 및 TA100 두 균주에 대하여 변이원성이 없는 것으로 나타났으며 발암물질인 B(α)P를 사용하여 EBRP에 대한 항돌연변이원성 실험결과 참취 EBRP의 경우 Table 2에서 나타난 바와 같이 4종류의 EBRP는 TA98 및 TA100 두 균주에 대하여 시료농도의 증가에 따라 강한 억제활성을 나타내었다. 2 mg 첨가시 TA98 균주에서는 pyrogallol EBRP의 경우 87.5%까지 억제하였으며 TA100 균주에 대해서도 4종류의 EBRP 모두 76.4%에서 89.7%까지 강한 억제효과를 나타내었다. 참나물 EBRP의 경우도 시료에 따라 차이는 있으나 두 균주에 대하여 강한 활성억제효과를 나타내었다. 식품성분 및 식품성분 상호작용에 의해 생성되는 물질들에 대한 돌연변이원성 실험 뿐만 아니라 항돌연변이원성 혹은 발암물질 활성을 억제하는 물질들에 대한 연구가 활발해지고 있는데 현재까지의 연구결과 비효소적 갈변반응 생성물의 최종생성물인 melanoidine도 B(α)P과 같은 발암물질의 활성을 강하게 억제시키며⁽²⁾ 변이원 물질로 알려진 nitrosamine의 생성을 강하게 억제하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁴⁾. 곰취, 참나물 및 참취의 효소에 의해 생성된 갈변반응 생성물도 melanin 색소로서 알려져 있기 때문에 변이원 물질의 억제활성을 나타내는 것으로 사료된다.

TA98 균주에서는 hydroxyhydroquinone EBRP의 경우 최고 91.1%, TA100주에서는 79.2%까지 억제되었다. 곰취 EBRP의 경우는 참취나 참나물 EBRP 보다는 다소

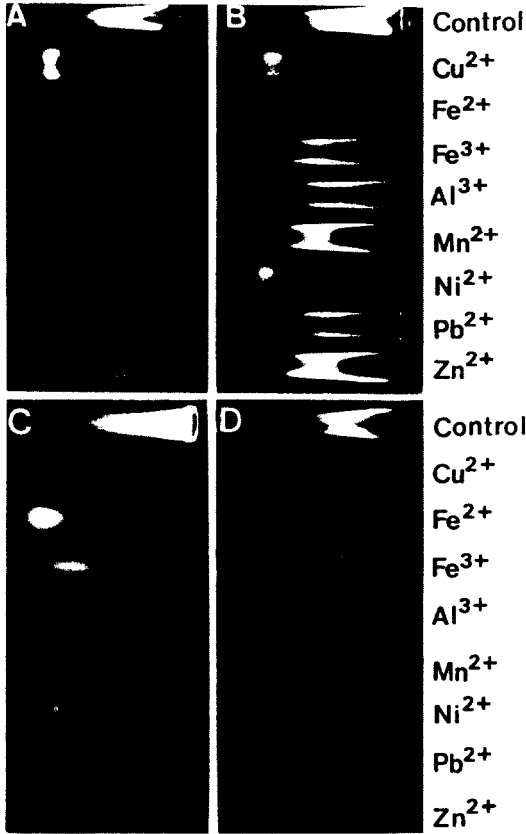


Fig. 1. Effect of various metal ions on the DNA-breaking action of enzymatic browning reaction product (EBRP) of *Aster scaber*

A : Pyrogallol EBRP
 B : 3,4-dihydroxytoluene EBRP
 C : Hydroxyhydroquinone EBRP
 D : Catechol EBRP

약한 것으로 나타났으나 TA98 균주에서는 3,4-dihydroxytoluene EBRP에서 77.9%, TA100주에서는 pyrogallol EBRP인 경우 60%까지 억제효과를 나타내었다. Table 3은 발암물질인 Trp-P-1 5 µg 첨가에 대한 참취 EBRP 활성억제 결과로서 EBRP 100 µl 첨가시 TA98 균주에 있어서 catechol EBRP와 pyrogallol EBRP 그리고 hydroxyhydroquinone EBRP는 각각 99%와 98.8%의 강한 억제효과를 나타내었으며 TA100 균주에서도 hydroxyhydroquinone-EBRP의 경우 93.4%, catechol-EBRP는 92% 그리고 pyrogallol-EBRP는 90.5%의 강한 억제효과를 나타내었다. 참나물 EBRP의 Trp-P-1에 대한 억제활성에서는 TA98 균주에서 pyrogallol-EBRP나 hydroxyhydroquinone-EBRP가 각각 99.3%와 98.6%의 강한 억제효과를 나타낸 반면 3,4-dihydroxytoluene EBRP의 경우는 19.8%의 낮은 억제효과를 나타내었다. TA100 균주에

Table 2. Antimutagenicity of the enzymatic browning reaction products(EBRP) of edible mountain herbs on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S-9 mix on the benzo(a)pyrene(B(a)P)

Enzyme	EBRP ^{a)}	Inhibition(%)	
		TA98	TA100
<i>Aster scaber</i>	Pyrogallol	87.5	89.7
	3,4-dihydroxytoluene	85.7	76.4
	Catechol	81.4	84.8
	Hydroxyhydroquinone	83.9	79.6
<i>Spuriopimpinella brachycarpa</i>	Pyrogallol	89.5	78.1
	3,4-dihydroxytoluene	60.1	58.3
	Catechol	70.7	55.2
<i>Ligularia fischeri</i>	Pyrogallol	91.1	79.2
	3,4-dihydroxytoluene	81.6	60.0
	Catechol	77.9	58.9
	Hydroxyhydroquinone	63.7	47.8
		42.1	54.3

a) Dose level of the EBRP in the system was 2.0 mg.

Table 3. Antimutagenicity of the enzymatic browning reaction products(EBRP) of edible mountain herbs on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S-9 mix on the 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)

Enzyme	EBRP ^{a)}	Inhibition(%)	
		TA98	TA100
<i>Aster scaber</i>	Pyrogallol	98.4	90.5
	3,4-dihydroxytoluene	30.9	56.3
	Catechol	99.0	92.0
	Hydroxyhydroquinone	98.8	93.4
<i>Spuriopimpinella brachycarpa</i>	Pyrogallol	99.3	90.1
	3,4-dihydroxytoluene	19.8	52.0
	Catechol	75.7	66.2
<i>Ligularia fischeri</i>	Pyrogallol	98.6	91.6
	3,4-dihydroxytoluene	99.3	91.9
	Catechol	98.3	91.9
	Hydroxyhydroquinone	99.3	91.7
		99.2	92.9

a) Dose level of the EBRP in the system was 100 µl.

대해서도 hydroxyhydroquinone-EBRP와 pyrogallol-EBRP가 각각 91.6%와 90.1%, catechol-EBRP와 3,4-dihydroxytoluene-EBRP의 경우 66.2%와 52%의 활성억제효과를 나타내었다. 참취 EBRP의 Trp-P-1에 대한 활성

Table 4. Antimutagenicity of the enzymatic browning reaction products(EBRP) of edible mountain herbs on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with S-9 mix on the 2-aminofluorene(2-AF)

Enzyme	EBRP ^{a)}	Inhibition(%)	
		TA98	TA100
<i>Aster scaber</i>	Pyrogallol	96.2	95.5
	3,4-dihydroxytoluene	50.5	61.4
	Catechol	98.1	88.3
	Hydroxyhydroquinone	92.1	86.6
<i>Spuriopimpinella brachycarpa</i>	Pyrogallol	99.0	87.0
	3,4-dihydroxytoluene	54.7	63.7
	Catechol	35.8	31.1
	Hydroxyhydroquinone	95.8	88.4
<i>Ligularia fischeri</i>	Pyrogallol	98.0	88.9
	3,4-dihydroxytoluene	95.1	87.0
	Catechol	98.0	90.0
	Hydroxyhydroquinone	96.7	86.8

a) Dose level of the EBRP in the system was 100 μ l.

억제효과에서는 TA98 균주에 있어서 catechol, pyrogallol, hydroxyhydroquinone 및 3,4-dihydroxytoluene EBRP 모두 99% 정도의 대단히 강한 활성억제효과를 나타내었고 TA100 균주에 대해서도 90% 이상의 높은

활성억제효과를 나타내었다. Table 4는 2-AF에 대한 활성억제효과로서 곰취 EBRP의 경우 TA98 균주에서는 catechol, pyrogallol, hydroxyhydroquinone-EBRP의 경우 98.1%, 96.2% 및 92.1%의 강한 억제효과를 나타내었으며 TA100 균주에 대해서도 pyrogallol-EBRP의 경우 95.5%, catechol-EBRP의 경우 88.3% hydroxyhydroquinone-EBRP는 86.6%의 억제효과를 나타내었다. 참나물 EBRP의 2-AF에 대한 활성억제효과에서는 100 μ l 첨가시 pyrogallol과 hydroxyhydroquinone의 경우 각각 99%와 95.8%의 강한 억제효과를 나타낸 반면 catechol-EBRP의 경우는 35%의 낮은 억제효과를 나타내었다. TA100 균주에 대해서도 pyrogallol과 hydroxyhydroquinone의 경우 각각 87%와 88.4%의 억제효과를 나타내었다. 곰취 EBRP의 (2-AF)에 대한 활성억제효과에서도 TA98 균주에 대해서도 4종류의 EBRP 모두 95% 이상의 강한 억제효과를 나타내었으며 TA100 균주에 대해서는 catechol-EBRP가 90%, 그리고 pyrogallol, hydroxyhydroquinone 및 3,4-dihydroxytoluene EBRP는 각각 88.9%, 86.8% 및 87%의 강한 억제활성을 나타내었다.

이와 같은 효소에 의해 생성되는 효소적 갈변반응 생성물들은 기질의 종류에 따라 다소 차이는 있으나 대부분의 EBRP는 B(α)P, Trp-P-1 및 2-AF와 같은 강한 변이원의 활성을 크게 억제시키는 결과를 얻었다. 그러나 갈변물질에 의해 변이원 물질이 목표물인 유전자에 도

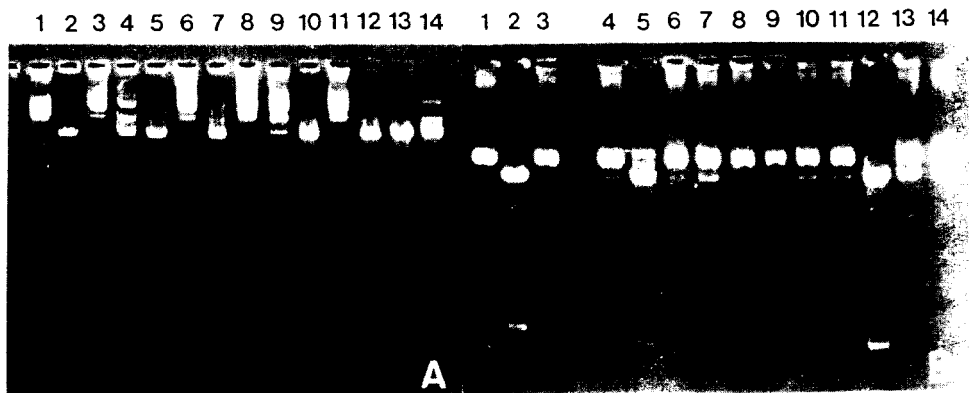


Fig. 2. Electrophoretic patterns of pGA658 cleaved with *EcoRI* in addition of enzymatic browning reaction product (EBRP)

Reaction mixture : DNA 4 μ l(0.5 μ g), salt 1 μ l, *EcoRI* 3 μ l(2.5 units), enzymatic browning reaction product(EBRP) 3 μ l(0.03 μ g) (A) and 0.06 μ g(B). Reaction condition : 37C, 45 min Electrophoresis condition : 60 voltage, 1.5 hrs, 0.9% agarose

- | | | |
|--|----------------------|---------------------------|
| 1. pGA658 | 8. " | hydroxyhydroquinone-EBRP |
| 2. " + <i>EcoRI</i> | 9. " | 3,4-dihydroxytoluene-EBRP |
| 3. <i>L. fischeri</i> pyrogallol-EBRP | 10. " | catechol-EBRP |
| 4. " catechol-EBRP | 11. <i>A. scaber</i> | pyrogallol-EBRP |
| 5. " 3,4-dihydroxytoluene-EBRP | 12. " | 3,4-dihydroxytoluene-EBRP |
| 6. " hydroxyhydroquinone-EBRP | 13. " | catechol-EBRP |
| 7. <i>S. brachycarpa</i> pyrogallol-EBRP | 14. " | hydroxyhydroquinone-EBRP |

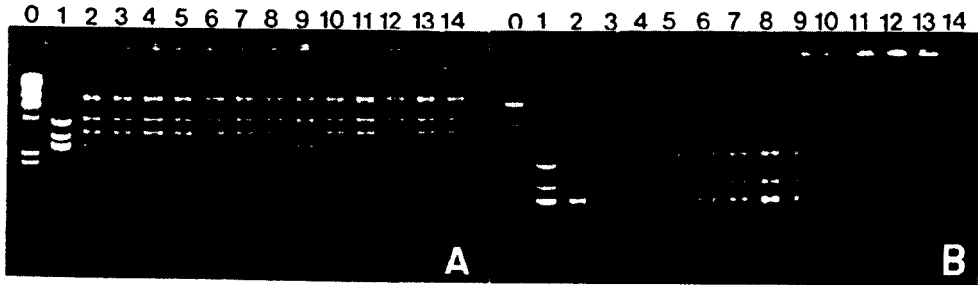


Fig. 3. Electrophoretic patterns of pGA658 cleaved with T_4 ligase in addition of enzymatic browning reaction product (EBRP)

Reaction mixture : DNA $20 \mu\text{l}$ (2.5 μg), salt $1 \mu\text{l}$, T_4 ligase $2 \mu\text{l}$ (400 units), EBRP $0.015 \mu\text{g}$ (A) and $0.03 \mu\text{g}$ (B).
 Reaction condition : 10°C , 24 hrs. Electrophoresis condition : 60 voltage, 2 hrs

0.	DNA <i>Hind</i> III digest				
1.	pGA658 <i>Sal</i> I digest				
2.	"	+	"	+ ligase	
3.	"	+	"	+ <i>L. fischeri</i> pyrogallol EBRP	
4.	"	+	"	+ catechol EBRP	
5.	"	+	"	+ 3,4-dihydroxytoluene EBRP	
6.	"	+	"	+ hydroxyhydroquinone EBRP	
7.	"	+	"	+ <i>S. brachycarpa</i> pyrogallol EBRP	
8.	"	+	"	+ catechol EBRP	
9.	"	+	"	+ 3,4-dihydroxytoluene EBRP	
10.	"	+	"	+ hydroxyhydroquinone EBRP	
11.	"	+	"	+ <i>A. scaber</i> pyrogallol EBRP	
12.	"	+	"	+ catechol EBRP	
13.	"	+	"	+ 3,4-dihydroxytoluene EBRP	
14.	"	+	"	+ hydroxyhydroquinone EBRP	

달하는 것을 억제하는지, 또는 변이원 물질을 제거하는지 등의 세포내에서의 억제작용에 관해서는 밝혀진 바 없으며 한편, 세포 밖에서의 변이원성 물질의 불활성화 작용도 예측할 수 있다.

효소적 갈변반응 생성물의 *Eco*RI 활성에 대한 영향

Fig. 2는 갈변반응 생성물 $0.03 \mu\text{g}$ (A) 과 $0.06 \mu\text{g}$ (B) 첨가시 시료농도 증가에 따라 *Eco*RI의 활성은 더욱 저해를 받았다. 특히 $0.06 \mu\text{g}$ 의 첨가시에는 12종류의 시료 중에서 곰취 3,4-dihydroxytoluene EBRP와 참취 3,4-dihydroxytoluene EBRP를 제외한 모든 반응 생성물이 *Eco*RI 절단작용을 억제함을 보여주었다. 이와 같은 농도는 Ames test에서 사용된 EBRP의 농도를 130배와 260배로 희석한 묽은 농도로서 낮은 농도에서도 *Eco*RI과 같은 endonuclease 활성이 저해됨을 알 수 있다.

효소적 갈변반응 생성물이 T_4 DNA ligase 활성에 미치는 영향

Fig. 3A는 갈변반응 생성물 $0.015 \mu\text{g}$ 을 첨가시 *Sal*I으로 절단된 DNA에 대한 ligase 활성에 어떠한 영향도 보이지 않았다. 그러나 $0.03 \mu\text{g}$ 첨가시에는 band 아랫부분의 작은 DNA fragment들이 첨가된 ligase에 의해 ligation

됨을 보여주고 있다. 이 결과는 제한효소 *Eco*RI 활성억제와는 상반되는 것으로서 소실되거나 결함이 있는 DNA염기의 절단, 또는 수복과정에서 DNA 절편의 재합성과 연결에 갈변반응 생성물의 긍정적 효과를 기대할 수 있다.

효소적 갈변반응 생성물이 DNA 손상에 미치는 영향

Table 5는 plasmid pGA658에 자외선 조사 또는 그에 상응하는 세포군에서의 처리 후 *E. coli* HB 101에 transformation시킨 결과이다. UV 손상을 주지 않고 EBRP를 첨가한 경우 transformation 빈도수는 시료 대부분에서 낮은 수치를 나타내고 있는 반면 UV 손상시에는 곰취의 pyrogallol, catechol 및 hydroxyhydroquinone-EBRP와 참나물의 progallol 및 catechol-EBRP가 특히 높은 수치를 나타내고 있다. 이와 같은 결과는 DNA의 분자력 차원에서 EBRP의 첨가에 대한 여러 가지 상이한 결과를 제시하고 있으며 그 기작에 대해서는 정확히 알 수 없으나 EBRP들이 DNA를 어떠한 방법으로든 보호하고 있는 것으로 생각된다. *E. coli*에 대한 DNA절단은 억제된 반면 ligase의 활성은 촉진 되었다. transformation 빈도 저하에 대해서는 EBRP를 함유한 세포가 오히려 외래 DNA의 침입에 대해 저항력이 높아지는 것으로 사료된

Table 5. The percentage of survival after transformation with or without UV irradiation
(relative to 100% as control)

	Added EBRP No. (0.06 µg) ^{a)}											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No UV light	186	210	247	31 ^{b)}	16 ^{b)}	10 ^{b)}	51 ^{b)}	76	34	106	120	55
UV light	135 ^{c)}	121 ^{c)}	373 ^{c)}	56	3	99	79	23	30	282 ^{c)}	59	36

a) 1. *A. scaber* ppo*+pyrogallol, 2. *L. fischeri* ppo+pyrogallol, 3. *S. brachycarpa* ppo+pyrogallol, 4. *A. scaber* ppo+hydroxyhydroquinone, 5. *L. fischeri* ppo+hydroxyhydroquinone, 6. *S. brachycarpa* ppo+hydroxyhydroquinone, 7. *A. scaber* ppo+3,4-dihydroxytoluene, 8. *L. fischeri* ppo+3,4-dihydroxytoluene, 9. *S. brachycarpa* ppo+3,4-dihydroxytoluene, 10. *A. scaber* ppo+catechol, 11. *L. fischeri* ppo+catechol, 12. *S. brachycarpa* ppo+catechol

*ppo : polyphenoloxidase

b) significant restriction of transformation(p<0.05)

c) significant DNA protection against UV damage(p<0.05)

다.

요 약

곰취, 참취 그리고 참나물로부터 polyphenoloxidase를 추출하여 polyphenol 화합물인 pyrogallol, hydroxyhydroquinone, catechol 그리고 3,4-dihydroxytoluene과 반응시켜 얻어진 12종류의 효소갈변반응 생성물의 생리작용을 검토한 결과 시료 모두 *rec*-assay, 돌연변이원성 실험 그리고 DNA 절단실험에서 돌연변이원성을 나타내지 않았다. 그러나 12종류의 시료 모두 S-9 mix를 첨가한 *Salmonella*/microsomal 실험에서 benzo(α)pyrene(B(α)P), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b) indole(Trp-P-1) 그리고 2-aminofluorene(2-AF) 등 변이원 물질들을 강하게 억제시키는 활성을 나타내었다. DNA repair 실험에서 효소갈변반응 생성물의 *E. coli* HB101에 plasmid pGA658의 transformation 빈도수는 곰취 효소갈변반응 생성물의 첨가에 의해 높은 수치를 나타내었으며 transformation 전에 DNA와 효소갈변반응 생성물을 혼합하여 자외선을 조사하였을 때 곰취의 pyrogallol, catechol, hydroxyhydroquinone의 효소갈변반응 생성물은 높은 수치를 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1988년도 문교부의 대학부설 유전공학연구구조 연구비 지원으로 이루어 졌음을 밝히며 이에 깊은 감사를 드린다.

문 헌

1. 함승시 : 재래종 황색자두 효소갈변 생성물의 돌연변이 억제작용. 한국농화학회지, 30(1), 71(1987)

- Kim, Eun-Ho : Formation of mutagen by browning reaction. Laboratory of Food chemistry, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ph. D. Thesis, Kyushu University, Japan.(1986)
- 大村浩久, 尊田民喜 : 食品の變色とスペクトルとの關係 (II), リンゴ酵素による褐變液の吸收スペクトル. 營養の食糧, 23, 367(1970)
- 大村浩久, 尊田民喜 : 食品の變色とスペクトルとの關係 (III), リンゴ果汁の吸收スペクトル. 營養と食糧, 22, 497(1969)
- 尊田民喜, 稻富良文, 淺田要一良, 吉川秀樹, 大村浩久 : 食品と變色のスペクトル係(VII). 九州大農學藝誌, 29(3), 71(1974)
- Kada, T., Tutikawa, K. and Sadaie, Y. : *In vitro* and host-mediated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected. *Mutation Res.*, 16, 165(1972)
- Thomas, M. and Davis, R. : Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *Eco*RI restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.*, 91, 315(1975)
- 함승시, 홍은희, 大村浩久 : 재래종 직색자두(*Prunus salicina*) 효소갈변반응 생성물의 돌연변이 억제작용. 한국식품과학회지, 19(3), 212(1987)
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasak, E. : Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31, 347(1975)
- 矢作多貴江 : 環境中の發ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする實驗法について. 蛋白質, 核酸, 酵素, 20, 1178(1975)
- Garner, R.C., Miller, E.C. and Miller, J.A. : Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Res.*, 32, 2058(1972)
- Birnboim, H.C. and Doly, J. : A rapid alkaline extrac-

- tion procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513(1979)
13. Mandel, M. and Higa, A., : Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53, 153(1970)
14. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by non-dialyzable melanoidines. *Agric. Biol. Chem.*, 51(5), 1333(1987)
-
- (1990년 5월 10일 접수)