Korean Journal of Food Preservation Vol. 9, No. 1, pp. 92~96 (2002) 한국식품저장유통학회지

비파 부위별 용매추출물의 아질산염 소거 및 항돌연변이 효과

배영일 · 정창호 · 심기환
경상대학교 응용화학식품공학부 · 농업생명과학연구원

Nitrite-scavenging and Antimutagenic Effects of Various Solvent Extract from Different Parts of Loquat (*Eriobotrya japonica*, Lindl.)

Young-Il Bae, Chang-Ho Jeong and Ki-Hwan Shim
Division of Applied Chemistry & Food Science and Technology/Institute of Agriculture & Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

The nitrite-scavenging and antimutagenic effects of various solvent extracts from different parts of the loquat were investigated to develope as source of functional food. The nitrite-scavenging and antimutagenic effects of fractions obtained from methanol extract were most highest in ethyl acetate fraction. Ethyl acetate fraction showed better results in the nitrite scavenging activity of 80% in leaf, 81% in seedless fruit, 73% in peel and 63% in seed. The antimutagenic effect showed strong ethyl acetate fraction of 53.1%, 48.3% in leaf and seedless fruit. The antimutagenic effect increased with increasing concentration of ethyl acetate fraction against mutagenicity induced by direct mutagen of IQ in *Salmonella typhimurium* TA 100. Addition of 2.5 mg and 5 mg of ethyl acetate fraction showed inhibitory effect of 65.5%, 71.2% in leaf and 63.4%, 69.2% in seedless fruit, respectively.

Key words : nitrite-scavenging activity, antimutagenic effect, ethyl acetate fraction, seedless fruit

서 론

비파(*Eriobotrya japonica*, Lindl.)는 장미과의 상록 교목으로 꽃은 10~11월에 백색으로 피며 향기가 좋고, 열매는 이듬해 6월에 황색으로 익는데, 우리 나라에서는 제주도, 경남 및 전남지방 등 온화한 기후 조건에서 주로 자생한다(1). 비파는 옛부터 민간요법으로 청폐, 진해, 거담, 건위, 이뇨, 패열해소, 기관지염, 구역질, 애기, 딸꾹질 및 부종 등에 효능이 있다고 알려져 있으므로 새로운 기능성 식품의 소재로서 활용가능성이 있을 것으로 추측된다(2).

최근에는 식품의 가공 및 저장 중에 널리 이용되고 있는 아질산염이 단백질 식품, 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 2급 및 3급 아민과 반응하여 생성된 nitrosamine이 독성물질로서 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중의 헤모글로빈이 산화되어 메트헤모글로빈을 형성하여 각종 질병을 일으키는 것으로 알려지면서 nitrosamine의 생성 억제능에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다(3-5).

그리고, 식품소재, 가공 및 조리 중에 생성되는 독성물질과 그 유도체가 발암을 일으킨다고 보고되면서, 최근에는 식용채소(6), 된장(7) 및 천연식물체(8) 등을 대상으로 한 각 용매 분획물의 돌연변이억제와 더불어 암세포 성장을 강하게 억제하는 것으로 밝혀짐에 따라 각종 천연자원과 식품소재를 이용하여 그 기능성 즉, 항돌연변이 및 아질산염 소거 효과 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 우리 나라 남부지방에 주로 재배되고 있는 비파 부위별 영양성분(9) 및 그 가공품에 관한 연구결과(10, 11)를 기초로 하여 새로운 기능성 소재로서의 활용가능성을 모색하고자 비파 부위별 추출물에 대한 아질산염 소거 및 항돌연변이 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 비파(*Eriobotrya japonica*, Lindl.)는 재래종인 전중(田中)을 1997년 10월에 경남 거제에서 재배된 것

Corresponding author : Ki-Hwan Shim, Division of Applied Chemistry & Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
E-mail : khshim@nongae.gsnu.ac.kr

을 채취 및 수확하여 냉동보관하면서 부위별(잎, 씨를 제거한 과실, 과피, 과육 및 종자)로 구분하여 실험하였다.

추출방법

시료의 용매별 추출은 건조시료 100 g에 물, 메탄올, 핵산, 클로로포름 및 에칠아세테이트를 각각 300 mL를 첨가하여 60℃에서 3시간 환류냉각 추출을 3회 반복하여 냉각한 다음 매회 여과한 여액을 혼합하고 회전진공농축기로 농축하여 시료로 사용하였다. 용매 분획별 시료는 시료 200 g을 메탄올 600 mL로 3회 추출하여 각 용매(메탄올, 핵산, 클로로포름 및 에칠아세테이트 등)별로 계통 분리하여 상기의 방법으로 농축한 후 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

아질산염소거 효과

추출물에 대한 아질산염소거 효과는 Gray와 Dugan(12)등의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 1 mM $NaNO_2$ 1 mL에 추출시료(2.5 mg)를 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2)을 사용하여 반응용액의 pH를 1.2로 조정한 후 반응용액의 부피를 10 mL로 하여 37℃에서 1시간 반응시킨다. 그리고 반응액 1 mL를 취하고 2% 초산용액 5 mL를 첨가한 다음 Griess 시약 0.4 mL를 가하여 혼합한 다음 15분 방치후 분광광도계를 사용하여 520 ㎚에서 흡광도를 측정하며, 공시험구는 시료 대신 증류수를 첨가하여 측정하였으며, 소거율은 제거된 아질산염의 백분율을 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$R\ (\%) = 1 - \left(\frac{C - B}{A - B}\right) \times 100$$

R : 아질산염 소거율
A : 1시간 반응후의 1 mM $NaNO_2$의 흡광도
B : 공시험구의 흡광도
C : 추출시료 첨가구의 흡광도

실험균주

항돌연변이원성 시험은 Maron과 Ames의 방법(13)에 따라 다음과 같이 실험하였다. 실험에 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성변이주(auxotroph)인 *Salmonella typhimurium* TA 100을 Califonia(USA) 대학의 B.N. Ames로부터 제공받아 사용하였고, Maron과 Ames 등의 방법(18)에 따라 histidine 요구성, deep rough (*rfa*) 돌연변이, *uvr*-B 돌연변이와 R-fator에 대한 유전형질을 확인하였다.

S-9 mixture의 조제

S-9 mixture의 조제는 Maron과 Ames의 방법(13)에 따라 약 200 g의 Sprague-Dawley rat (male) 3마리에 해부 5일 전에 corn oil 200 mg/mL의 Aroclor 1254를 섞은 용액을 1회 복강주사(500 ㎎/㎏)하여 제조하였다. 적출된 간의 1 g당 1 ㎖의 냉각된 150 mM KCl이 함유된 비이커에 옮겨서 무게를 측정하고 수회에 걸쳐 충분히 혈액을 세척한 후 homogenize하여 초원심분리(9000×g, 10 min)하고 그 상징액인 S-9 fraction을 얻었으며 무균적으로 1~2 mL cryo tube에 분주하여 dry ice에 급냉시켜 -80℃의 deep freezer(Il shin Lab Co., Korea)에 보관하였다. Deep freezer의 S-9 fraction(5%)은 균처리전에 실온에 녹여 1 M Na_2HPO_4, 300 mM KH_2PO_4, 120 mM $MgCl_2$, 12 mM EDTA, 16 mM NADH, 16 mM NADP, 3차 증류수 및 200 mM glucose-6-phosphate를 각각 혼합하여 S-9 mixture를 조제하였다.

Preincubation test

항돌연변이원성 시험은 preincubation test를 이용하여 다음과 같이 분석하였다. 즉, 돌연변이원에 의해 유도된 복귀 돌연변이수는 하룻밤 배양된 균주(1~2 x 10^9 cells/mL) 0.1 mL, S-9 mixture 0.5 mL, 돌연변이 유발물질 2-amino-3-methyl-imidazo [4,5-f]quinoline(IQ/0.02㎍) 50 ㎕ 및 DMSO 50 ㎕, 자연복귀 돌연변이수는 균주 0.1 mL, S-9 mixture 0.5 mL 및 DMSO 100 ㎕, 시료 첨가 복귀 돌연변이수는 균주 0.1 mL, S-9 mixture 0.5 mL, IQ 50 ㎕ 및 시료 50 ㎕를 각각 멸균된 screw cap에 첨가하여 vortex하였다. 그리고, 37℃에서 30분간 예비 배양한 후 45℃의 top agar (0.5% NaCl, 0.5 mM L-histidine/d-biotin 10%) 2 mL을 각 tube에 붓고 vortex한 다음 최소 포도당 한천평판배지(Vogel-Bonner 최소배지)에 도말하고, 37℃에서 48시간 배양한 후 revertant 수를 측정하였다.

통계처리

통계처리는 SAS 프로그램 중에서 분산분석(ANOVA)를 실시하여 Duncan's multiple range test로 시료간의 유의성을 검정하였다(14).

결과 및 고찰

용매별 아질산염 소거 효과

비파의 부위별 아질산염 소거 효과를 추출 용매별로 분석한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 용매별 추출물의 경우, 메탄올 추출물에서 씨를 제거한 과실 86%, 종자 84%, 잎 60%, 과피 57% 및 과육 35% 순으로 나타났으며, 그외 핵산, 클로로포름 및 물 추출물에서는 낮았다. 부위별의 경우, 씨를 제거한 과실과 종자에서 각각 86%와 84%로 메탄올 추출물에서 아질산염 소거 효과가 높게 나타났다.

Table 1. Nitrite-scavenging effects of various solvent extracts from different parts of loquat

Sample	Nitrite-scavenging effect (%)			
	Methanol ext.	Hexane ext.	Chloroform ext.	Water ext.
Leaf	60	-[2)]	-	40
Fruit[1)]	86	13	16	10
Flesh	35	-	-	-
Peel	57	5	10	6
Seed	84	-	-	66

[1)]Seedless fruit.
[2)]Not detected.

용매분획별 아질산염 소거 효과

비파의 용매별 추출물 중 아질산염 소거 효과가 가장 높은 메탄올 추출물을 극성 및 비극성 용매로 분획한 추출물을 이용하여 아질산염 소거 효과를 분석한 결과는 Table 2와 같다. 즉, 에칠아세테이트 분획물에서 잎은 80%, 씨를 제거한 과실 81%, 과피 73% 및 종자 63%로 높게 나타났으며, 핵산, 클로로포름 및 부탄올 등의 분획물에서는 아질산염 소거 효과가 낮았다. 이러한 결과는 기능성이 확인된 솔잎(85%)과 쑥추출물(84%)의 아질산염 소거 효과와 유사하였으나 결명자 추출물(95.3%)보다는 그 효과가 낮게 나타났다(15, 16).

Table 2. Nitrite-scavenging effects of various solvent fractions of methanol extract from different parts of loquat

Sample	Nitrite-scavenging effect (%)				
	Hexane fr.	Chloroform fr.	Ethyl acetate fr.	Butanol fr.	Water fr.
Leaf	-[2)]	41	80	-	-
Fruit[1)]	-	-	81	-	-
Flesh	-	-	-	-	-
Peel	-	-	73	-	-
Seed	-	-	63	-	-

[1)]Seedless fruit.
[2)]Not detected.

용매분획별 항돌연변이 효과

비파잎과 씨를 제거한 과실의 메탄올 추출물을 비극성 및 극성 용매별로 분획하여 항돌연변이 효과를 분석한 결과는 Table 3 및 4와 같다. 즉, 분획물의 항돌연변이 효과를 확인하기 위해 *Salmonella typhimurium* TA 100 균주를 대상으로 각 추출물을 처리하여 돌연변이 억제효과를 확인한 결과, 잎의 경우 에칠아세테이트 분획물에서 53.1%, 핵산, 클로로포름, 물, 부탄올 및 메탄올 분획물은 각각 34.0%, 33.2%, 30.5%, 19.1% 및 14.1% 순으로 나타났다. 씨를 제거한 과실의 경우, 에칠아세테이트 분획물에서 48.3%에서 높게 나타났으나 비파잎의 에칠아세테이트 분획물보다 돌연변이 억제효과가 낮았다.

Table 3. Inhibitory effects of various solvent fractions of methanol extracts from loquat leaf on the mutagenicity induced by IQ in *Salmonella typhimurium* TA 100

Treatment[1)]	Extract concentration (㎎/plate)	Revertants/plate[2)] *Salmonella typhimurium* TA 100[3)]	Inhibitory ratio(%)
Hexane fr.	2.0	173±12[b4)]	34.0
Chloroform fr.	2.0	175±24[b]	33.2
Ethyl acetate fr.	2.0	123±06[c]	53.1
Butanol fr.	2.0	212±03[a]	19.1
Water fr.	2.0	182±03[b]	30.5

[1)]Various extract fractions from methanol extract of loquat leaf.
[2)]Each assay contains S-9 (5%) + 100 ㎕ sample.
[3)]Mean±SD of three experiments.
[4)]Value in each column with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 4. Inhibitory effects of various solvent fractions of methanol extracts from loquat seedless fruit on the mutagenicity induced by IQ in *Salmonella typhimurium* TA 100

Treatment[1)]	Extract concentration (㎎/plate)	Revertants/plate[2)] *Salmonella typhimurium* TA 100[3)]	Inhibitory ratio (%)
Hexane fr.	2.0	418 ± 7[bc4)]	33.0
Chloroform fr.	2.0	460 ± 2[a]	27.0
Ethyl acetate fr.	2.0	310 ± 3[d]	48.3
Butanol fr.	2.0	357 ± 5[c]	42.3
Water fr.	2.0	446 ± 7[b]	39.2

[1)]Various extract fractions from methanol extract of loquat fruit excluded seed.
[2)]Each assay contains S-9 (5%) + 100 ㎕ sample.
[3)]Mean±SD of three experiments.
[4)]Value in each column with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

에칠아세테이트 분획물의 농도별 항돌연변이 효과

비파잎과 씨를 제거한 과실의 분획물 중 에칠아세테이트 분획물을 농도별 첨가하여 돌연변이 억제효과를 확인한 결과는 Table 5 및 6과 같다. 즉, 잎의 에칠아세테이트 분획물을 0.5 mg, 2.5 mg 및 5.0 mg 농도에서 각각 36.6%, 65.5% 및 71.2%로 돌연변이 억제효과가 나타났으며, 씨를 제거한 과실의 경우 0.5 mg 농도에서 31.0%, 2.5 mg과 5.0 mg 농도에서 각각 63.4%와 69.2%로 분획물의 농도가 증가함에 따라 돌연변이 억제효과도 비례적으로 증가하였다. 또한 박(17)은 비파잎의 에칠아세테이트 분획물 2.5%를 첨가하였을 때 aflatoxin B_1에 대하여 74%의 돌연변이 억제효과를 확인하였다.

Table 5. Inhibitory effects of ethyl acetate concentrations from loquat leaf on the mutagenicity induced by IQ in *Salmonella typhimurium* TA 100

Extract concentration[1] (㎎/plate)	Revertants/plate[2] Salmonella typhimurium TA 100[3]	Inhibitory ratio (%)
0.5	166 ± 5[a4)]	36.6
1.5	119 ± 4[b]	54.6
2.5	91 ± 5[bc]	65.5
5.0	76 ± 1[c]	71.2

[1)]Ethyl acetate fractions from methanol extract of loquat leaf.
[2)]Each assay contains S-9(5%) + 100 ㎕ sample.
[3)]Mean±SD of three experiments.
[4)]Value in each column with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 6. Inhibitory effects of ethyl acetate concentrations from loquat seedless fruit on the mutagenicity induced by IQ in *Salmonella typhimurium* TA 100

Extract concentration[1] (㎎/plate)	Revertants/plate[2] *Salmonella typhimurium* TA 100[3]	Inhibitory ratio (%)
0.5	506 ± 7[a4)]	31.0
1.5	369 ± 3[b]	49.7
2.5	269 ± 2[c]	63.4
5.0	241 ± 3[c]	69.2

[1)]Ethyl acetate fractions from methanol extract of loquat fruit exclude seed.
[2)]Each assay contains S-9 (5%) + 100 ㎕ sample.
[3)]Mean±SD of three experiments.
[4)]Value in each column with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

요 약

비파 부위별 추출물의 아질산염 소거능 및 항돌연변이 효과를 조사한 결과는 다음과 같다. 추출용매 중 활성이 높게 나타난 메탄올 추출물을 비극성~극성 용매별로 계통분획한 에칠아세테이트 분획물에서 잎은 80%, 씨를 제거한 과실 81%, 과피 73% 및 종자 63%로 아질산염 소거 효과가 가장 높게 나타났다. 메탄올 추출물의 분획하여 *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 항돌연변이 효과를 측정한 결과, 잎과 씨를 제거한 과실의 에칠아세테이트 분획물에서 각각 53.1%, 48.3%로 높게 나타났다. 에칠아세테이트 분획물을 농도별로 첨가하여 항돌연변이 효과를 확인한 결과, 잎과 씨를 제거한 과실의 경우 에칠아세테이트 분획물 2.5 mg과 5.0 mg 첨가시 각각 65.5%, 71.2%와 63.4%, 69.2%로 분획물의 농도가 높을수록 항돌연변이 효과가 높게 나타났다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 핵심전문연구과제 (961-0605-037-2) 연구결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이창복 (1982) 대한식물도감. 향문사, p.684-687
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경준 (1998) 중약대사전. 도서출판 정담, 5, 2468-2475
3. Mirvish, S.S. (1970) Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst., 44, 633-639
4. Normington, K.W., Baker, I., Molina, M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. and Puju, S. (1986) Characterization of a nitrite scavenger 3-hydroxy-2-pyranone, from chinese wild plum juice. J. Agric Food Chem., 34, 215-221
5. Do, J.R., Kim, S.B., Park, Y.H., Park, Y,B. and Kim, D.S. (1993) The nitrite-scavenging effects by the component of traditional tea materials. Korean J. Food Sci. Technol., 25, 530-534
6. Lai, C.N., Butter, M.N. and Matney, T.S. (1980) Mutaion Res., 77, 245-250
7. Park, K.Y., Moon, S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S. (1990) Antimuta-genic effect of Doenjang(Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. J. Korean Soc. Food Nutr., 19, 156-162
8. Park, D.S., Lee, K.I. and Park, K.Y. (2001) Quantitative analysis of dietary fibers from Perilla frutescens seeds and antimutagenic effect of its extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30, 900-905
9. Bae, Y.I. and Shim, K.H. (1998) Nutrition components in different of Korean loquat(*Eriobotrya japonica* Lindl.). Korean J. Postharvest Sci. Technol., 5, 57-63
10. Bae, Y.I., Seo, K.I., Park, S.K. and Shim, K.H. (1998) Loquat(Eriobotrya japonica Lindl.) leaf tea processing and its physicochemical properties. Korean J. Postharvest Sci. Technol., 5, 262-269
11. Bae, Y.I., Moon, J.S. and Shim, K.H. (1998) Loquat (Eriobotrya japonica Lindl.) juice processing and its physicochemical properties. Korean J. Postharvest Sci. Technol., 5, 270-274
12. Gray, J. and Dugan Jr.L.R. (1975) Inhibition of N-Nitrosamine formation in model food system. J. Food Sci., 40, 981-985

13. Maron, D.M. and Ames. B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut. Res., 113, 173-178
14. SAS (2001) SAS User's Guie. Statistical Analysis Systems Institute, version 8.0, Cary, NC., U.S.A.
15. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D. (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 978-982
16. Do, J.R., Kim, S.B., Park, Y.H., Park, Y.B., Choi, J.S. and Kim, D.S. (1993) The nitro-scavenging effects by the component of cassiae Torae Semen Korean J. Food Sci. Technol., 25, 526-531
17. 박수완 (1991) 비파잎에서 분리한 Triterpenoid의 화학적 특성 및 약리효과에 관한 연구. 경성대학교 석사학위논문.

(접수 2002년 1월 18일)