

## 무즙의 돌연변이 억제 효과 및 그 특성

김석중 · 진재순 · 김동만 · 김길환

한국식품개발연구원

### Inhibitory Effect of Radish Juice on the Mutagenicity and Its Characteristics

Seok-Joong Kim, Jae-Soon Jin, Dong-Man Kim and Kil-Hwan Kim

Korea Food Research Institute

#### Abstract

The inhibitory effects of radish juice on the mutagenicities of cigarette smoke condensate (CSC), methanol extract of charred part of fried or broiled saury pike (MECS) and 2-aminofluorene (2-AF) were examined by the use of Ames assay toward *Salmonella typhimurium* TA 98 strain. Radish juice exhibited inhibition percentage of about 100, 100 and 87 on the mutagenicities of CSC, two kinds of MECS and 2-AF, respectively. Except for juices of cabbage and leek, radish juice has inhibited more effectively the mutagenicity of CSC than other fruit or vegetable juices studied. Inhibitory effect of radish juice might be originated from the components with molecular weight above 50,000 and decreased sharply in 5 min by heat treatment at 100°C, but hardly changed at low and moderate storage temperatures such as 4°C, 10°C, 25°C and 35°C for about 2 weeks. Precipitate obtained from ammonium sulfate saturation from 30 to 80% had inhibitory effect on the mutagenicity of CSC. Extracts from 3 bands of non-denaturing gel of 30~80% ammonium sulfate precipitate have exhibited the inhibitory effects on the mutagenicity of CSC.

Key words: radish juice, cigarette smoke condensate, desmutagenicity, heat treatment, electrophoresis

## 서 론

우리들이 상용하고 있는 식품중 일부에 함유된 돌연변이원들은 Ames/Salmonella 방법<sup>(1)</sup>에 의해 속속 검출되고 있으며, 특히 가열, 조리된 식품에 대해서 돌연변이 유발능이 보고되어 왔고<sup>(2)</sup> 그중 생선 및 육류등에서 돌연변이원의 생성<sup>(3)</sup>, 열처리된 밀의 탄수화물에서 돌연변이원의 생성<sup>(4)</sup> 등이 잘알려져 있다. 그리고 식품외에 환경오염과 관련된 디젤 연소가스, 음식의 조리시 발생하는 연기, 담배연기 등에 대한 돌연변이원성이 보고되었고<sup>(5,6)</sup> 특히, 담배연기의 경우는 돌연변이원성 및 발암성에 대해 많은 연구가 진행되었다<sup>(7, 13)</sup>.

한편 과·채류들은 트립토판의 열분해 물질인 Trp-p-1, Trp-p-2 등의 돌연변이원에 대해 억제 효과가 있음이 알려져 있다<sup>(14-18)</sup>. 그러나 국내 생산 과·채류중 배추와 더불어 총생산량의 60% 이상을 점하는 매우 중요한 작목인 무<sup>(19)</sup>에 대해서는 돌연변이 억제효과에 대한 연구가 거의 없는 실정이므로 본 연구에서는 *Salmonella typhimurium* TA98 균주를 이용한 Ames법으로 무의 돌연

변이 억제효과에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 무 및 그외 과·채류즙의 조제

전북 고창에서 수확한 백경품종의 가을 무(*radish*: *Raphanus sativus*)를 수세, 절단하고, 믹서(Osterizer)로 조식을 파쇄하여 여과포로 여과한 후 9,000×g, 4°C 조건에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취해 -20°C에서 보관했다. 그외 양파, 미나라, 깻잎, 양배추, 숙주, 고추, 달래, 쪽갓, 부추, 감자, 고구마, 시금치, 피망, 생강, 당근, 적채, 냉이, 양상치, 대파, 오이, 사과, 감자, 배추 등도 같은 방법으로 즙을 조제했다.

### 담배연기 응축물(cigarette smoke condensate: CSC)의 조제

시중에서 1종류의 권연을 구입하여 Fig. 1과 같은 깻연장치<sup>(20)</sup>를 이용하여 담배를 연소시켰는데, 1회 깻연시간은 2초, 깻연부피는 35 ml/2초, 깻연주기는 60초였다. 깻연시 연소부위에서 발생하는 연기(부류연: side stream smoke)는 아스피레이터를 이용하여 제거하였고, 깻연부위에서 발생하는 연기(주류연: main stream smoke)는 냉각기를 통과시켜 2장의 glass-fiber 필터

Corresponding author: Kil-Hwan Kim, Food Science and Technology Laboratory, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun, Bundang, Songnam, Kyonggi 463-420, Korea

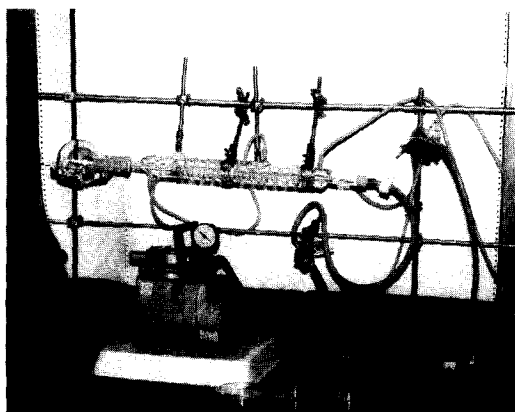


Fig. 1. Smoking apparatus for the collection of main stream cigarette smoke on the filter system composed of two glass fiber filters and one polycarbonate filter

(Gelman Science, Mich.)와 1장의 polycarbonate 필터 (Nucleopore, Calif.)로 이루어진 필터 시스템을 통과시키면서 0.3  $\mu\text{m}$  이상의 에어로졸을 필터에 포집했다. 이 필터들을 플라스크에 넣고 1l 메탄올로 하루동안 추출한 후 여과한 다음 여과액을 감압 농축시켜 17.64 mg/담배1본의 CSC를 얻었다. 이것을 661.5 ml dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### 태운삼치의 메탄올 추출물(methanol extract of charred saury pike : MECS)의 조제

삼치를 통째로 프라이팬에 놓고 가스버너의 중불에서 20분간 구운 다음 탄부분을 긁어모아 메탄올 500 ml로 하루동안 추출한 다음 여과하여 감압농축하여 얻은 4.02 g의 농축물을 2.0 ml의 DMSO에 녹여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 다른 삼치 추출물은 삼치를 프라이팬 대신 석쇠를 사용하여 직화로 구운 다음, 같은 방법으로 처리하여 5.656g을 얻어 11.312 ml의 DMSO에 녹여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### 2-Aminofluorene의 조제

표준돌연변이원인 2-aminofluorene의 경우 1 mg을 1 ml의 DMSO에 녹여 사용하였다.

#### 돌연변이 억제효과의 조사

CSC와 태운 삼치의 메탄올 추출물에 대한 돌연변이 원성을 조사하기 위해 *Salmonella typhimurium* TA 98을 이용하였는데, Ames법<sup>(1)</sup>을 약간 변형한 방법<sup>(21)</sup>을 사용하였다.

돌연변이원으로서 CSC와 2종의 태운 삼치의 메탄올 추출물(MECS) 그리고 2-aminofluorene (2-AF)을 각각 DMSO에 녹여 60  $\mu\text{l}$ 와 40  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ 씩 멸균된 캡시험관에 넣은후 50 mM, pH 6.8의 인산완충액 0.5 ml를 넣고 30

분간 incubation하였다. 이에 top agar 3 ml를 첨가한 후 CSC의 경우는 10%, 2종의 MECS 및 2-AF의 경우는 4% S-9 mixture를 0.5 ml씩 넣고 하루 배양한 균주를 ( $1\sim 2 \times 10^9$  cells/ml) 0.1 ml씩 첨가하여 교반한 후 minimal glucose agar plate에 도말한 다음  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양하여 복귀돌연변이균(revertants) 수를 세었다. 돌연변이 억제효과를 조사하기 위해서는 인산 완충액 대신에 과채류즙을 0.5 ml 첨가하였으며 이때 돌연변이 억제효과의 정도 (inhibition percentage)는  $[(a-b)/(a-c)] \times 100$  (%)로 나타내었는데 여기서 a는 돌연변이원만 존재할 경우의 복귀돌연변이균수, b는 과·채류즙을 첨가 하였을때의 복귀돌연변이균수, c는 돌연변이원과 과·채류즙이 없는 경우의 자연 복귀돌연변이 균수이다.

Ames assay에 사용한 S-9은 Organon Teknika사 (Durham, N.C.)의 제품을, 나머지 cofactor들은 Sigma사 (St. Louis, MO. U.S.A.)의 제품을 이용하였다.

#### 무즙의 한외여과

Molecular weigh cut-off치가 다른 5종의 Amicon막 (XM 50 : >50,000 MW, PM 30 : >30,000 MW, PM 10> 10,000 MW, YM 2 : >1,000 MW, YC 05 : >500 MW)을 이용하여 무즙을 분자량별로 분획하였다.

#### 무즙의 열처리

$100^{\circ}\text{C}$  항온수조에서 예열된 캡시험관 (Pyrex,  $16 \times 125$  mm)에 무즙 3 ml를 넣고 뚜껑을 닫은 후 시간별로 시험관을 꺼내어 얼음속에 급냉시킨 다음  $10,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상등액을 사용하였다.

#### 무즙의 저장

필터 (0.2  $\mu\text{m}$  pore size, Gelman Science)로 멸균 처리한 무즙을  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 저장하면서 시간별로 시료를 취하여  $10,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리한 다음 상등액만 사용하였다.

#### Ammonium sulfate fractionation

무즙 1l에 ammonium sulfate를 30%(w/v)로 포화시켜  $10,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻어 소량의 50 mM, pH 6.8의 인산완충액으로 녹인후 투석시켜 염을 제거한 다음 원래의 농도를 희석시킨다. 그 다음 침전을 제거한 상등액을 80%까지 포화시켜 같은 방법으로 30~80% 침전물 용액을 얻는다. 그다음 최종 상등액은 염을 제거한 후 그대로 돌연변이 억제효과 실험에 이용하였다.

#### 단백질 함량의 측정

Bradford 방법<sup>(22)</sup>을 이용하여 과·채류즙의 단백질 함량을 측정하였으며, 시약은 Bio-Rad protein assay 시약 (Bio-Rad, Richmond)을 사용하였다.

**Non-denaturing PAGE**

Davis의 방법<sup>(23)</sup>을 이용하여 실시하였으며, 이때 stacking은 4.4%, separating gel은 7.7% 농도를 사용하였으며 loading한 sample양은 20 µl였다. 여기서 150 V의 전압을 일정하게 흘려 5시간 동안 전개한 후에 메탄올-아세트산-물(25 : 10 : 65) 혼합용액에 0.8% coomassie blue R-250을 녹인 staining 용액에서 5시간 염색한 후에 메탄올-아세트산-물(25 : 10 : 65)로 구성된 destaining 용액에서 24시간 탈색하였다.

**결과 및 고찰**

**무즙의 돌연변이 억제 효과**

CSC와 2종의 태운 삼치의 메탄올 추출물 (MECS)의 돌연변이원성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 S-9 mixture를 첨가하지 않은 경우 모두 복귀돌연변이균수가 증가하지 않았고, S-9 mixture를 첨가한 경우 복귀돌연변이균수가 증가하여 이 물질들이 간접돌연변이원인 것으로 나타났다. 돌연변이 억제능을 조사하기 위해 각 plate당 CSC의 경우 400 µg, MECS 중에서 프라이팬에서

태운 삼치의 경우 40 mg, 석쇠에서 태운 삼치의 경우 10 mg를 처리하였다. 또한 발암물질로 알려진 2-aminofluorene(2-AF)의 경우에는 20 µg/plate를 이용하였다. 이와같은 농도의 각 돌연변이원에 무즙을 첨가하였을때 CSC에 대해서는 100%, MECS 2종에 대해서 각각 100%, 2-AF에 대해서는 87% 정도의 억제효과를 보였다(Table 1).

이들 돌연변이원 중에서 CSC에 대한 무즙의 돌연변이 억제효과를 다른 과·채류즙과 비교해 본 결과를 Table 2에 나타내었는데 무는 양배추, 부추 등과 더불어 다른 과채즙에 비해 매우 높은 억제효과를 나타냈다. CSC의 돌연변이원성에 대하여 무즙에 존재하는 억제인자가 어느 정도의 분자량을 갖는 물질인지를 조사하기 위해 한외여과막을 이용하여 무즙을 분자량 50,000 이상 50,000~30,000 사이, 30,000~10,000 사이, 10,000~1,000 사이, 1,000~500 사이, 500 이하가 되게 각각 분획하여 억제효과를 조사한 결과 억제인자는 분자량이 50,000 이상인 물질임을 알 수 있었다(Table 3).

한편 CSC의 돌연변이원성에 대한 무즙 함유 억제인자의 열안정성을 조사하기 위해 100°C에서 열처리 하였

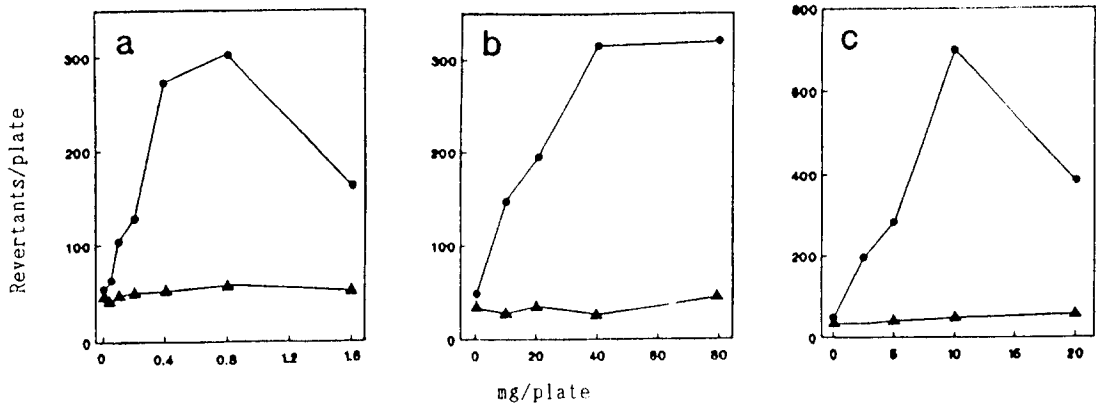


Fig. 2. Mutagenicity of CSC (a), two kinds of MECS b: fried, c: broiled) toward *Salmonella typhimurium* TA 98 in the presence(●—●) or absence(▲—▲) of s-9 mixture CSC and MECS indicated cigarette smoke condensate and methanol extract of charred saury pike (fried saury pike: b, broiled saury pike: C), respectively

Table 1. Inhibitory effect of radish juice on the mutagenicity of cigarette smoke condensate(CSC), methanol extract of charred saury pike(MECS) and 2-aminofluorene(2-AF) toward *Salmonella typhimurium* TA 98

Mutagens	Revertants/plate		Inhibition percentage(%)
	- radish juice	+ radish juice <sup>1)</sup>	
Spontaneous	45 ± 8	51 ± 2	
CSC (400 µg/plate)	268 ± 19	50 ± 2	100
MECS			
Fried saury pike(40 mg/plate)	315 ± 63	44 ± 4	103
Broiled saury pike (10 mg/plate)	700 ± 20	43 ± 1	101
2-AF (20 µg/plate)	5361 ± 749	727 ± 37	87

<sup>1)</sup>As inhibitory factor on the mutagens, radish juice was added

**Table 2. Inhibitory effects of the juices extracted from some fruits and vegetables on the mutagenicity of CSC**

Samples	Inhibition percentage
Radish	101
Onion	2
Dropwort	77
Sesame leaf	74
Cabbage	122
Green bean sprout	61
Red pepper	40
Wild rocambole	93
Crown daisy	86
Leek	110
Spinach	70
Piment	1)
Ginger	90
Carrot	7
Red cabbage	81
Pickpurse	83
Lettuce	75
Welsh onion	75
Cucumber	81
Persimmon	51
Apple	19
Potato	72
Sweet potato	29
Chinese cabbage	10

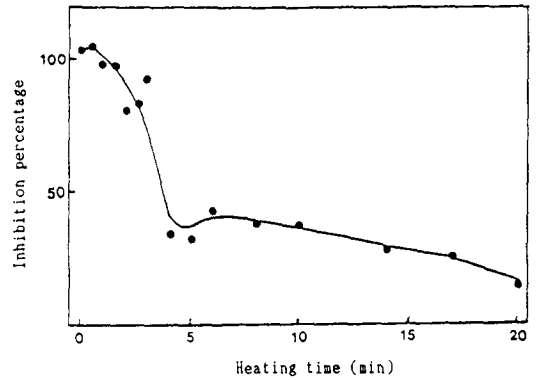
<sup>1)</sup>Revertants per plate exceeded the level of those occurred by CSC

**Table 3. Inhibitory effect of each fraction obtained from ultrafiltration of radish juice using membranes of different molecular weight cut-offs on the mutagenicity of CSC**

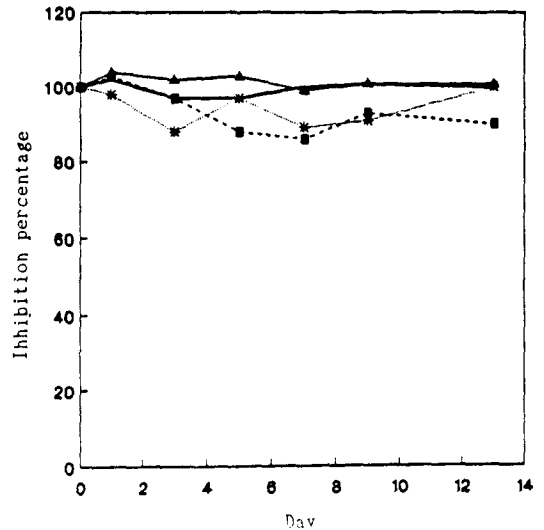
Range of molecular weight	Inhibition percentage
> 50,000	114
50,000~30,000	0
30,000~10,000	1
10,000~ 1,000	0
1,000~ 500	10
< 500	6

던바 Fig. 3에서와 같이 2분 열처리시까지는 돌연변이 억제효과가 크게 감소치 않았으나 5분 처리 후에 50% 이하까지 감소한 것으로 보아 이 억제인자는 열에 불안정한 물질로 생각되었다. 이 물질이 저·중온에서의 저장 기간에 따른 억제효과 변화를 보기위해 4°C, 10°C, 25°C, 35°C에서 약 2주간 저장하면서 억제능을 조사해본 결과(Fig. 4) 4°C, 10°C에서는 억제효과의 변화가 없었으며, 25°C, 35°C에서도 90% 이상의 억제효과를 유지하는 것으로 나타났다.

열에 불안정하고 50,000 이상의 분자량을 가지는 이 같은 물질에 대해 단백질과의 관계를 알아보기 위해



**Fig. 3. Change of inhibitory effect of radish juice on the mutagenicity of CSC with heat treatment at 100°C**



**Fig. 4. Change of inhibitory effects of radish juices stored at various temperatures on the mutagenicity of CSC**

●—●; 4°C, ▲—▲; 10°C, \*—\*; 25°C, ■—■; 35°C

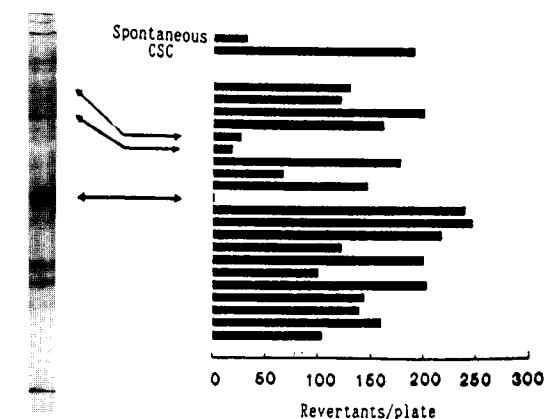
무우즙을 ammonium sulfate로 0~30, 30~80%로 포화시켜 얻은 침전물 및 남은 상등액 각각을 무즙 원래의 농도가 되게 조절하고 CSC에 대한 돌연변이 억제효과를 조사해 본 결과 ammonium sulfate 농도, 30~80% 사이에서 분획한 것이 무즙원액과 같은 억제효과를 나타내었다(Table 4).

이와같은 효능을 가진 침전물 분획을 사용하여 non-denaturing 전기영동을 실시한 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 이 gel에서 각 band를 증류수로 추출하여 CSC에 대한 돌연변이 억제효과를 조사한 결과 Fig. 5와 같이 3개의 band에서 억제효과를 보였다. 따라서 무즙에서 CSC에 대한 돌연변이 억제효과를 나타내는 물질은 최

**Table 4. Inhibitory effect of each fraction obtained from ammonium sulfate saturation of radish juice on the mutagenicity CSC**

Ammonium sulfate fractionation	Total protein content <sup>1)</sup> (mg/l)	Amount of protein used (µg/plate)	Inhibition percentage
Crude radish juice	654	32.7	103
Precipitate obtained by 0~30% saturation	24.5	12.25	19
Precipitate obtained by 30~80% saturation	403.0	201.5	94
Superantant obtained by 80% saturation	1.7	0.85	24

<sup>1)</sup>Initial volume of radish juice was 1000 ml



**Fig. 5. Non-denaturing PAGE of precipitate obtained from radish juice saturated with ammonium sulfate from 30 to 80%. Arrows indicated the bands exhibiting the inhibitory effect on the mutagenicity of CSC**

소한 3종류 이상일 것으로 추정되었다.

**요 약**

*Salmonella typhimurium* TA 98 균주를 사용한 Ames법을 실시하여 무즙의 돌연변이 억제효과 및 특성에 대해 조사하였다. 무즙은 간접 돌연변이원인 것으로 조사된 담배연기응축물(CSC), 태운 삼치의 메탄올 추출물(MECS) 2종에 대해서는 각각 100% 정도의 억제효과를 보였고, 발암물질인 2-aminofluorene(2-AF)에 대해서는 87% 정도의 억제효과를 나타내었다. 그리고 무즙은 양배추, 부추 등과 더불어 CSC에 대해서 조사된 다른 과·채류에 비해 높은 억제효과를 나타냈다. 무즙에서 CSC에 대해 억제효과를 나타내는 물질은 분자량이 50,000 이상으로 100℃의 열처리시 5분 이내에 효과가 50% 이하로 감소하였으나 중·저온에서는 약 2주간 효과가 유지되는 것으로 조사되었다. 또한 ammonium sulfate 30~80%로 포화시켜 얻은 무즙 침전물이 돌연변이 억제 효과가 큰것으로 나타났으며 이를 native-PAGE를 실시하였던바 3종류의 band 추출물이 CSC에 대해 돌연변이 억제효과가 있는것으로 나타났다.

**문 헌**

1. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 173(1983)
2. Wishnok, J.S.: The mutagens that cooking produces. *Chemtech.*, June, 348(1984)
3. Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T.: Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and mmeat. *Cancer Letters*, 2, 221(1977)
4. Friedman, M., Wilson, R.E. and Ziderman, I.I.: Mutagen formation in heated wheat gluten, carbohydrates and gluten, carbohydrate blends. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1019(1990)
5. Austin, A.C., Claxton, L.D. and Lewtas, J.: Mutagenicity of the fractionated organic emission from disel, cigarette smoke condensate, coke oven and roofing tar in Ames assay. *Environ. Mutagen.*, 7, 471(1985)
6. Lewtas, J., Goto, S., Williams, K., Chuang, J.C., Peterson, B.A. and Wilson, N.K.: The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilot field study: Application and evaluation of new methodologies. *Atmospheric Environ.*, 21, 443(1986)
7. Löfroth, G., Burton, R.M., Forehand, L., Hammond, S.K., Sella, R.L., Zweidinger, R.B. and Lewtas, J.: Characterization of environmental tobacco smoke. *Environ. Sci. Technol.*, 23, 610(1989)
8. Löfroth, G. and Lazaridis, G.: Environmental tobacco smoke. *Environ. Mutagen.*, 8, 693(1986)
9. Wilmer, J.W.G.M. and Spit, B.J.: Influence of retinoids on the mutagenicity of cigarette smoke condensate in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Mutat. Res.*, 173, 9(1986)
10. Löfroth, G. and Lazaridis, G.: Environmental totacco smoke: Comparative characterization by mutagenicity assay of sidestream and mainstream cigarette smoke. *Environ. Mutagen.*, 8, 693(1986)
11. Shirname, L.P., Mennen, M.M., Murdia, U.S. and Bhide, S.V.: Comparision of mutagenicity of Indian cigarettes and Bidi smoke condensate. *Indian J. Experimental Biol.*, 23, 145(1985)
12. Jongen, W.M.F., Hakkert, B.C. and Van der Hoeven, J.C.M.: Genotoxicity testing of cigarette smoke condensate on the SCE and HGPRT assays with V 79 Chinese hamster cells. *Fd. Chem. Toxic.*, 23, 603(1985)
13. Hirayma, T.: Diet and cancer. *Nut. Cancer*, 1, 67(1979)
14. Shinohara, K., Kuroki, S., Miwa, M., Kong, Z.L. and

- Hosoda, H.: Antimutagenicity of dialysates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1369(1988)
15. Morita, K., Nishijima, Y. and Kada, T.: Chemical nature of a desmutagenic factor from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 925(1985)
  16. Inoue, T., Morita, K. and Kada, T.: Purification and properties of a plant desmutagenic factor for the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 345(1981)
  17. Morita, K., Hara, M. and Kada, T.: Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235 (1978)
  18. Indriati, E., Jongen, W.M.F. and Pilnik, W.: Antimutagenic effects of apple juices: Interference with heat load measurement by microbiological methods. *J. Food Sci.*, **55**, 1026(1990)
  19. 한국농촌경제연구원(편) : 식품수급표. 한국농촌경제연구원 (1989)
  20. Skoropinski, D.B., Callis, J.B. and Christian, G.D.: Analytical study of cigarette smoke enriched in benzo(a)pyrene for use in model animal studies. *Microchemical J.*, **31**, 7(1985)
  21. Morita, K., Kada, T. and Namiki, M.: A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Mutat. Res.*, **129**, 25(1984)
  22. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976)
  23. Davis, B.J.: Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404(1964)
- 
- (1991년 12월 11일 접수)