

돌연 변이원에 대한 마(Dioscorea batatas DECENE)추출물의 억제 효과

이임선 · 정세영* · 신창섭** · 구성자
경희대학교 가정대학, 경희대학교 약학대학*, (주)김정문알로에**

Inhibitory Effect of Yam (Dioscorea batatas DECENE) Extracts on the Mutagenicity

Im-Seon Lee, Se-Young Chung*, Chang-Sub Shim** and Sung-Ja Koo
Department of Food and Nutrition, Kung Hee University
*College of Pharmacy, Kung Hee University, **Kim-Jung Mun Aloe Co., Ltd.

Abstract

The inhibitory effects of methanol, ethanol, chloroform/ methanol and water extracts from natural and cultured yams on the mutagenicity in the cooked pork (broiled and panfried) and the chemically induced mutagen, sodium azide, benzo(a)pyrene and 2-aminofluorene were investigated using *salmolla typhimurium* TA 100. In the presence of the S9 mixture, ethanol extract from natural yam showed high inhibitory effect on the mutagenicity of the cooked pork. But benzo(a)pyrene, supposed to be produced in mutagen during cooking, did not show high inhibitory effect in same extract. Besides, the yam extract on the mutagenicity of the sodium azide without S9 mixture showed low inhibitory effect. However 2-aminofluorene with S9 mixture showed high inhibitory effect, 91.5%.

I. 서 론

고령화 인구비율이 높은 산업사회에 살면서 예방의학 분야에 대한 관심고조, 식생활의 서구화, 외식의 증가, 영양의 불균형으로 건강에 대한 지대한 관심이 집중되고 있다. 따라서 식품의 개념도 종래의 영양성과 기호성에서 기능성과 자연성이 강조되고 있다. 이러한 사회적 변화와 더불어 몇몇 식품에서 질병, 예방학적인 생리활성물질이 규명되고 있어서 식품의 기능성이 한층 더 강조되면서 식품산업계가 급속도로 신장되고 있다. 이러한 기능성 식품의 일환으로 우리나라에서 건강식품으로 그 수요가 증가추세에 있는 것의 하나로 마(Yam)를 들 수 있다.

마는 한방에서 자양강장, 당뇨병, 폐결핵, 빈뇨 및 지사에 사용되고 있으며¹⁾ 당뇨병 환자나 위장병 환자의 치료, 또는 예방 차원에서 건강식품으로 이용되고 있다. 식용방법으로는 갈아서 계란 노른자, 간장, 김과 함께 먹거나 우유에 타서 또는 전으로 부쳐 섭취하고 있다. 또한 마는 알칼리성 식품으로 여러가지 효소가 함유되어 있어서 고구마나 감자와 달리 생식하여도 소화 흡수가 잘되므로 노약자나 어린이를 위한 건강

식품으로 개발의 여지가 있다고 생각한다.

마에 관한 지금까지의 연구는 주로 식품소재 가공 적성면으로 마전분의 이화학적 특성^{2,6)}이나 물성연구 및 점질다당류의 분리정제 등^{7,9)}이 주로 연구되어 왔으나 최근에는 마의 기능특성으로는 정 등¹⁰⁾의 Polyphenol oxidase의 특성과 효소갈변생성물의 항돌연변이 효과와 신¹¹⁾의 2-AF와 MNMG에 대한 마식이섬유의 항돌연변이 효과가 발표된 바 있어 마의 기능특성에 대한 연구가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 따라서 본연구에서는 마추출물이 돼지고기의 broiling과 Panfrying 조리법으로 형성된 변이원과 화학적으로 유도된 sodium azid, benzo(a)pyrene 및 2-aminofluorene (2-AF) 등의 순수변이원에 대한 억제 효과를 검토함으로써 마의 생체 조절 기능을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 산마와 재배마는 1994년 11월 서울 경동시장에서 구입하여 껍질을 벗기고 수세하여 세절한 후 동결건조하여 분말화 한 후 dessicator에 보

관하면서 사용하였다. 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA100은 유전공학 연구소에서 분양받았으며 S 9은 화학 연구소에서 제공 받았고 S9 cofactor는 Wako사로부터 benzo(a)pyrene, sodium azide 및 2-AF (2-aminoflourene)는 Sigma사로부터 구입하였고 기타 시약은 특급 또는 일급 시약으로 사용하였다.

2. 시료 제조

건조 분말화한 마를 중량의 10배의 methanol(MeOH), ethanol(EtOH), methanol/chloroform를 1:1로 혼합한 용액(CHCl₃/MeOH)과 물(Water)을 각각 가한 후 실온에서 하룻밤동안 교반하면서 추출한후 10,000 rpm에서 40분간 원심분리(centrifuge: Hanil)하였다. 상정액은 여지로 여과한 후 MeOH, EtOH, CHCl₃/MeOH 추출액은 70°C에서 감압농축(rotary evaporate: buchi, R110)하여 plate당 10 mg이 되도록 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹였고 Water 추출물은 동결건조(freeze dryer: ilshin)한 후 고점성으로 인하여 plate당 10 mg 농도가 불가능하였으므로 plate당 1.7 mg이 되도록 멸균 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 변이원 제조

돼지고기를 일정한 크기(5 cm×10 cm×1 cm)로 자른후 전보¹²⁾에서와 같이 조리하였다. broiling과 Pan-frying한 시료는 50% MeOH로 추출한 후 원심분리하여 상정액은 감압농축 후 -80°C(deep freezer: advantage)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 본실험에 사용된 변이원농도는 전보¹²⁾의 *Salmonella typhimurium* TA 100균주에서 S9 mixture를 첨가하지 않았을 때 돼지고기의 각 조리법에서 가장 높은 변이원성을 보인 농도로서, 생시료 무게로 plate당 0.1 g으로 하였다. 그 외 benzo(a)pyrene과 2-AF는 plate당 각각 20 µg과 10 µg이 되도록 DMSO에 녹였고 sodium azide는 증류수에 녹여 plate당 0.2 µg로 하였다.

3. Ames test

Salmonella typhimurium TA 100균주에 대한 유전형질, 즉 histidine 영양요구성, 세포막의 고분자 투과성, uv에 의한 유전자 복구능력의 상실, Plasmid pkm-101의 존재 등을 확인한 후 Maron과 Ames 등의 Preincubation법¹³⁾에 의거 실험하였다. 한시료에 대하여 3개의 최소평판배지(minimal glucose agar plate)를 사용하였으며 통계처리는 SAS를 이용한 Duncan다중분석법으로 행하였고 변이원에 대한 억제율은 다음과 같이 계산되었다.

$$\text{Inhibitory effect (\%)} = \frac{a-c}{a-b} \times 100$$

- a: 변이원만 첨가했을 때의 복귀돌연변이균수(revertants)
- b: *Salmonella typhimurium* TA 100의 자연복귀 돌연변이균수(Spontaneous revertants)
- c: 변이원 및 마추출물을 함께 첨가했을 때의 복귀돌연변이균수(revertants)

III. 결과 및 고찰

동결건조하여 분말화한 마를 MeOH, EtOH, CHCl₃/MeOH, Water로 추출한 추출물의 broiling과 pan-frying의 조리시 형성된 변이원 및 화학적으로 유도된 순수변이원인 2-AF, benzo(a)pyrene, sodium azide에 대한 억제효과는 다음과 같다.

1. 조리시 형성된 변이원에 대한 억제효과

Broiling과 panfrying의 변이원종류, 산마와 재배마의 마종류, MeOH, EtOH, CHCl₃/MeOH, Water의 추출 용매종류 및 이들 상호 관계사이의 유의성은 대사활성 물질인 S9 mixture 무첨가시 변이원과 용매종류 및 변이원과 용매들간의 상호관계에서, S9 mixture 첨가시 변이원, 마, 용매종류에서 보였으나 이들 상호관계 사이에서는 유의성이 나타나지 않았다. S9 mixture첨가 유무에 따라 유의성을 보였던 변이원, 마, 용매종류에 대한 억제효과를 Table 1에 나타냈다. 변이원 종류에 대한 억제효과는 S9 mixture 무첨가시 broiling이 53.7%, panfrying이 44.8%로, broiling에 대한 억제효과가 높았으나 S9 mixture첨가시 broiling이 44.4%, panfrying이 59.6%로서 panfrying이 더 높은 억제효과를 보였다. 마종류의 변이원에 대한 억제효과는 S9 mixture 무첨가시 산마가 46.9%, 재배마가 51.3%로 유의성이 없었으나 S9 mixture 첨가시 산마가 55.5%, 재배마가 48.1%로 산마가 높았다. 추출 용매종류의 변이원에 대한 억제효과는 S9 mixture 무첨가시 Water가 37.9%로 가장 낮았고 MeOH와 EtOH가 각각 50.0%와 47.2%로 비슷하였으며 CHCl₃/MeOH가 60.5%로 가장 높았다. S9 mixture 첨가시에도 water가 29.6%로 가장 낮았으나 MeOH가 51.3%, CHCl₃/MeOH가 57.6%, EtOH가 68.7%로서 조리법 변이원 중 간접변이원에 대하여 EtOH 추출물의 억제효과가 가장 높게 나타났다. S9 mixture 무첨가시 상호관계에서 유의성을 보였던 변이원과 추출용매사이의 억제효과는 Fig. 1과 같

Table 1. Inhibitory effect of yam extracts on the mutagenicity in the cooked pork with or without S9 mixture (%)

Sou.	Mutagen		Yam		Solvent			
	broiling	panfrying	Natural	Cultural	MeOH	EtoH	Ch/Me	Water
-S9	53.7 ^a	44.8 ^b	46.9 ^{NS}	51.3 ^{NS}	50.0 ^b	47.2 ^b	60.5 ^a	37.9 ^c
+S9	44.4 ^b	59.6 ^a	55.5 ^a	48.1 ^b	51.3 ^c	68.7 ^a	57.6 ^b	29.6 ^d

Sou: source, -S9: without S9 mixture, +S9: with S9 mixture, MeOH: methanol, EtOH: ethanol, CHCl₃/MeOH: Chloroform and methanol, NS: not significant.

The values with small alphabets(a, b, c, d) are statistically significant at $p < 0.05$ within row under the source.

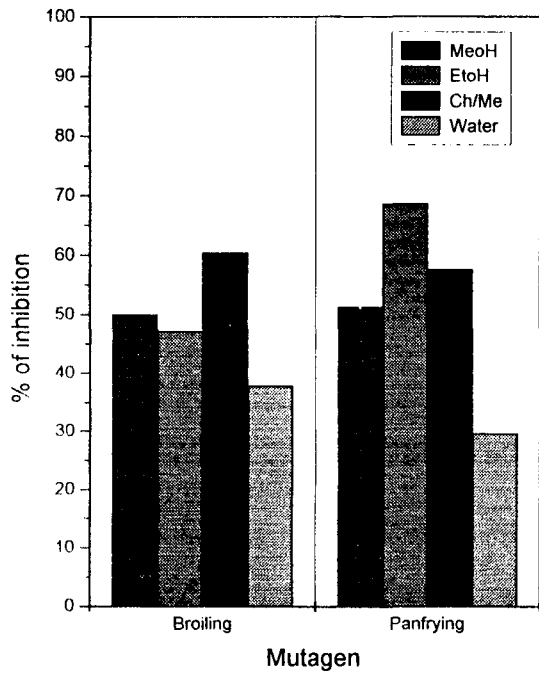


Fig. 1. Inhibitory effect solvent of yam extracts on the mutagenicity in the cooked pork without S9 mixture (MeOH: methanol, EtOH: ethanol, CHCl₃/MeOH: chloroform and methanol).

다. broiling 변이원에 대하여 water가 36.6%, EtOH가 46.6%, MeOH가 61.0%, CHCl₃/MeOH가 69.5%로 CHCl₃/MeOH 추출물이 가장 높았으며 panfrying 변이원에 대하여 water가 39.2%, MeOH가 40.5%, EtOH가 47.8%, CHCl₃/MeOH이 51.5%로 broiling과 panfrying 변이원 종류와 관계없이 조리법 변이원 중 직접 변이원은 CHCl₃/MeOH 추출물에서 억제효과가 높았다.

Lijinsky¹⁴⁾와 많은 연구자들은¹⁵⁻¹⁸⁾ 단백질 식품을 구울 때 당과 아미노산 그리고 creatinine의 maillard 반응에 의해 IQ, MEIQ, MEIQX 등의 heterocyclic amine 및 benzo(a)pyrene 등의 암을 유발할 수 있는 변이원 물질이 형성된다고 보고하였다. 조리법 변이원에 포함되어 있을 것으로 예상되는 benzo(a)pyrene은 대사 활성화 물

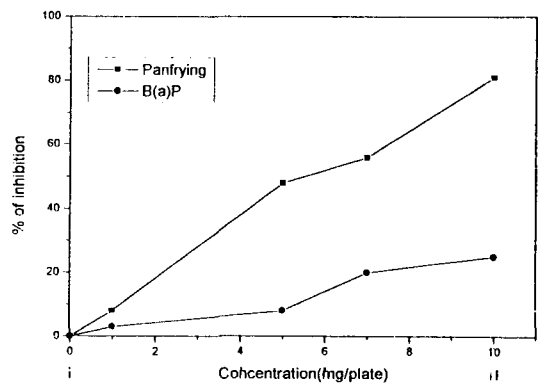


Fig. 2. Inhibitory effect of ethanol extracts from natural yam on the mutagenicity in panfried pork or benzo(a)pyrene add with S9 mixture (B(a)P: benzo(a)pyrene).

질을 필요로 하는 간접 변이원이므로 benzo(a)pyrene과 Table 1에서 S9 mixture 첨가시 억제효과가 높았던 panfrying 변이원에 대한 산마의 EtOH 추출물의 농도에 따른 억제효과를 Fig. 2에 나타냈다. 산마 EtOH 추출물의 panfrying과 benzo(a)pyrene에 대한 억제효과는 plate당 1 mg 농도일 때 각각 8.0%와 2.8%로 낮았으나 panfrying이 5 mg 농도에서 48.0%인 것에 비교하여 benzo(a)pyrene은 8.0%로 낮았다. 이들 변이원에 대한 산마 EtOH추출물의 가장 높은 억제효과는 plate당 10 mg 농도에서 panfrying이 80.8%, benzo(a)pyrene가 25.0%를 나타냈다. 산마 EtOH 추출물은 panfrying 변이원에 대하여 농도증가에 따른 억제효과가 크게 증가한것에 비교하면 panfrying 변이원에 함유되어 있을 것으로 예상되었던 benzo(a)pyrene에 대하여 억제효과가 낮았다. 이는 panfrying 변이원에는 benzo(a)pyrene보다 산마 EtOH 추출물에서 높은 억제효과를 보일 것으로 보이는 2-Amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-quinoline(IQ), 2-Amino-3, -dimethylimidazo[4,5-f]-quinoline(MEIQ), 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline(MEIQX) 등의 heterocyclic amine 등의 함량이 상대적으로 높은 것으로 사료된다. Shinohara 등¹⁹⁾은 시금치의 EtOH 추

Table 2. Inhibition effect of yam extracts on the mutagenicity of sodium azide and 2-AF(%) (%)

Source	Yam		Solvent			
	Natural	Cultural	MeOH	EtOH	Ch/Ne	Water
Sodium azide	25.4 ^a	9.1 ^b	17.4 ^{NS}	13.5 ^{NS}	18.3 ^{NS}	19.6 ^{NS}
2-AF	52.9 ^{NS}	45.6 ^{NS}	41.9 ^b	45.0 ^b	84.0	26.2 ^c

2-AF: 2-aminoflourene, MeOH: methanol, EtOH: ethanol, CHCl₃/MeOH: chloroform and methanol, NS: not significant. The values with small alphabets (a, b, c, d) are statistically significant at $p < 0.05$ within row under the source.

출물이 benzo(a)pyrene에 대한 억제효과가 Sepadex G-25 gel 여과획분에서 25-81%였으며 추출물 첨가용량 보다는 빨리 유출된 획분에서 비교적 높은 억제효과를 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 benzo(a)pyrene에 대하여 산마 EtOH 추출물의 첨가량을 증가 시키는 것보다 추출물의 정제과정이 필요하였던 것으로 사료된다.

2. Sodium azide와 2-AF에 대한 억제효과

Sodium azide와 2-AF에 대한 마 추출물의 변이원에 대한 억제효과를 Table 2에 나타냈다. Sodium azide에 대한 마 종류의 억제효과는 산마가 25.4%, 재배마가 9.1%로서 산마가 효과적이었다. 그러나 Water을 포함한 MeOH, EtOH, CHCl₃/MeOH 등의 용매종류에 대하여 sodium azide는 유의성을 보이지 않았으며 억제효과도 낮았다. 다른 용매보다 물로 추출한 guava가 59.9%로 높은 억제효과를 보여 sodium azide에 대하여 수용성 성분이 효과적이었다는 Grover연구²⁰⁾와 비교시 본 연구의 물추출물에서는 그 효과가 인정되지 않았다. 이는 guava가 물로 추출한 후 멸균을 위해 filter를 통과시킨 후 실험에 사용한 반면 본실험의 마는 점성이 높아 filter 사용이 불가능하여 동결건조하여 이용하였으므로 sodium azide에 대한 돌연변이성을 억제할 수 있는 성분은 고분자량보다 저분자량을 가진 물질로 추측된다.

2-AF에 대한 마 종류의 억제효과는 산마가 52.9%, 재배마가 45.6%로 마 종류에 관계없이 높은 억제효과를 보였다. 용매종류에 대한 억제효과는 26.2%인 Water, 41.9%인 MeOH, 45.0%인 EtOH에 비교하여 CHCl₃/MeOH가 84.0%로 다른 용매보다 높았다. Data를 제시하지 않았으나 CHCl₃/MeOH 추출물 중 특히 산마는 91.5%로서 2-AF에 대한 억제효과가 55%인 두릅생즙²¹⁾과 87%인 무즙²²⁾의 보다 높았다. 산마 CHCl₃/MeOH 추출물의 농도에 따른 억제효과는 Fig. 3과 같이 plate당 1 mg의 저농도에서도 67.0%의 높은 억제효과를 보였으며 5 mg에서는 87.3%, 7 mg에서 91.03% 그리고 10 mg에서는 91.5%를 나타냈다. 따라서 2-AF

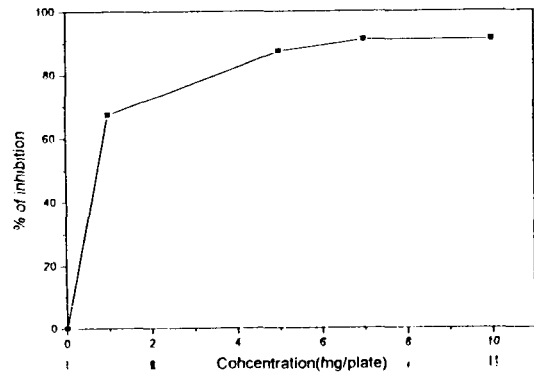


Fig. 3. Inhibitory effect of Ch/Me extracts from natural yam on the mutagenicity of 2-aminoflourene with S9 mixture (Ch/Me: chloroform and methanol).

에 대한 산마 CHCl₃/MeOH 추출물은 plate당 10 mg의 고농도에서 뿐만 아니라 1 mg의 저농도에서도 67.0%의 높은 억제효과를 보임으로써 단위 추출물당 억제활성이 가장 높았다. 따라서 앞으로의 연구는 CHCl₃/MeOH 추출물 중에 함유되어 있는 2-AF에 대한 억제활성 인자를 분리하는 것을 검토하고자 한다.

IV. 요약

용매(MeOH, EtOH, CHCl₃/MeOH Water)를 달리한 마추출물의 broiling과 panfrying의 조리법 변이원과 2-AF, benzo(a)pyrene, sodium azide 등의 화학적으로 유도된 순수변이원에 대한 억제효과를 검색하였다.

대사활성물질인 S9 mixture 무첨가시 조리법 변이원에 대한 변이원과 용매종류 및 변이원과 용매사이의 상호관계성은 유의적인 차이를 보였으나, S9 mixture 첨가시에는 변이원, 마, 용매종류들사이에 유의성을 보였다. 특히 S9 mixture 첨가시 높은 억제효과를 보였던 산마 EtOH 추출물은 panfrying 변이원에 대한 억제효과는 컸으나 조리법 변이원에 포함되었을 것으로 예상되었던 benzo(a)pyrene에 대해서는 억제효과가 낮았다. 순수변이원로서 sodium azide에 대한 마추출물은 산마가 25.4%로, 9.1%인 재배마보다 높았으나

용매에 따른 유의성은 없었다. 2-AF는 마종류에 대한 유의성은 없었으나 Water가 26.2%, MeOH가 41.9%, EtOH가 45.0%, CHCl₃/MeOH가 84.0%로서 높은 억제 효과를 보였다. 특히 산마의 CHCl₃/MeOH 추출물은 plate당 10 mg 농도에서 가장 높은 91.5%의 억제효과를 보였을뿐 아니라 plate당 1 mg 농도에서도 67%의 높은 억제효과를 나타내었다.

이상과 같이, 본 실험에 사용된 변이원 중 2-AF에 대한 산마 CHCl₃/MeOH 추출물이 단위 추출물당 억제활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 1995년도 보건의료기술 연구 개발 과제에 의해 수행한 연구결과의 일부로 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- 정보섭: 도해 향약(생약) 대사전, 신문고, 148 (1985).
- Onayem O.: Some chemical factors affecting the quality of processed yam, *J. of food science*, **51**(1): 161-164 (1986).
- Kazunori Hironaka, Katsuyosi Takada, Kenichi Ishibashi: Chemical composition of mucilage of chinese yam, *Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**(1): 48-51 (1990).
- Frederick I.O. and Anthony V.U.: Fatty acid composition of mucilage of total lipids from some tropical storage organs, *J. sci. fd agric.*, **29**: 959-962 (1978).
- Anthony V.U. and Fred I.O.: Composition of lipids in Dioscorea tubers, *J. agric. food chem.*, **30**: 993-996 (1982).
- Bohoussou K. and Jacques D.: Total amino acids and thir evolution during storage, *J. sci. food agric.*, **42**: 273-285 (1988).
- 최일숙, 이임선, 구성자: 마(Dioscorea batatas Decaisne) 전분의 Rheology 및 열적 특성에 관한연구, 한국조리과학회지, **8**(1): 57-63 (1992).
- 이부용, 이영철, 김홍만, 김철진, 박무현: 마전분 호화액의 리올리지 특성, 한국 식품과학회지, **24**(6): 619-622 (1992).
- 水口 純·鈴木 周一, 戸倉 正利: Ichoimo 점질물 의정제 성질, *日化誌*, **88**(2): 106-110 (1967).
- 정승희, 이임선, 구성자: 마의 Polyphenol oxidase의 특성과 효소 갈변 생성물의 항돌연변이효과, 한국조리과학회지, **10**(4): 339-345 (1994).
- 신남희: 2-AF와 MNMG에 대한 마 식이섬유의 돌연변이 억제효과, 경희대학교 대학원 석사학위논문 (1995).
- 이은경, 이임선, 신남희, 정승희, 구성자: 여러가지 조리 방법으로 조리된 조기와 돼지고기의 돌연변이원성의 검색, 한국조리과학회지, **11**(1): 77-82 (1995).
- Maron D.M. and Ames B.N.: Revised methods for the salmonella mutagenicity test, *Mut. Res.*, **113**: 173-213 (1983).
- Linjinsky W. and Shubik P.: Benzo(a)pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat, *Science*, **145**: 53-55 (1964).
- Hiroko Ohgaki, Shozo Takayama and Takashi Sugimura: Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, *Mutation Res.*, **259**: 399-410 (1991).
- Takashi Sugimura: Carcinogenicity of heterocyclic amines formed during the cooking process; *Mutation Res.*, **150**: 33-41 (1985).
- Ohgaki H., Hasegawa H., Suenaga M., Sato S., Takayama S., Sugimura T.: Carcinogenicity in mice of a mutagenic compounds, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline(MEIQX) from cooked foods, *Carcinogenesis*, **8**: 665-668 (1987).
- Hargraves W.A., Pariza M.W.: Purification and mass spectral characterization of bacterial mutagens from commercial beef extract, *Cancer Res.*, **43**: 1467-1472 (1983).
- Shinohara K., Zwe-ling k., Fukuda T.: Desmutagenic actions of spinach on Trp-P-2, *Nippon shokhin kogyo gakkaishi*, **38**(3): 242-248 (1991).
- Grover I.S., Bala S.: Studies on antimutagenic effects of guava(Psidium guajava) in Salmonella typhimurium, **300**: 1-3 (1993).
- 한규석, 함승시, 정의호, 이해금: Trp-p-1과 2-AF에 대한 산채류생즙의 항돌연변이효과, 한국위생학회지, **7**(4): 161-168 (1992).
- 김석중, 진재순, 김동만, 김길환: 무즙의 돌연변이 억제효과 및 그 특성, 한국식품과학회지, **24**(3): 193-198 (1992).