

트립토판 열분해물 유발 변이원성에 대한 현미 및 백미의 억제 효과 비교

유정은 · 전향숙* · 조정순

명지대학교 식품영양학과 · 한국식품개발연구원 생물공학 연구부*

A Comparison of Inhibitory Effects in Brown and White
Rice(*Oryza sativa* L.) against Mutagenicity Induced
by Tryptophan Pyrolysates

You, Jung Eun · Chun, Hyang Sook* · Cho, Jung Soon

Department of Food and Nutrition, Myong-Ji University

Food Biotechnology Division, Korea Food Research Institute*

ABSTRACT

The inhibitory effect of rice(*Oryza sativa* L., illpumbyeo) against mutagenicity induced by tryptophan pyrolysates were investigated using *Salmonella typhimurium* reversion assay. Both methanol extracts obtained from brown and white rice were found to possess strong activities of inhibiting the mutagenicities of 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol(Trp-P-1) and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol(Trp-P-2) on *Salmonella typhimurium* reversion assay. As the concentration of methanol extract increased, inhibitory effect on mutagenicity increased but reached at steady state as inhibition rate of 90% when the concentration was above 10mg/plate. There was no significant difference($p>0.05$) in inhibitory effect of methanol extracts between brown and white rice against tryptophan pyrolysates.

KEY WORDS : rice, mutagenicity, tryptophan pyrolysates, *Salmonella typhimurium* reversion assay

서 론

쌀(*Oryza Sativa* L.)은 밀, 옥수수와 더불어 세계 3대 곡물이며 우리 나라의 일상 식생활에서 주식으로

써 널리 이용"되어 왔다. 그러나 최근 경제 성장과 더불어 식생활의 변화는 곡류 중심의 식생활에서 동물성 식품과 가공 식품의 섭취가 증가되었고 조리 방법에 있어서도 굵거나 삶고 튀기는 방법으로 변화

되었다. 이러한 변화는 각종 성인병의 발병을 더욱 가속²⁻⁴⁾시키게 되었다.

우리 나라 병인별 사망 원인 중 1위를 차지하고 있는 암 발생의 대부분은 식이와 30~60% 관련이 있다는 역학 조사^{5,6)}가 있었다. 식품 중 존재하는 것으로 알려진 변이원성을 포함하는 발암성 물질 특히 조리 가공 중 생산되는 tryptophan pyrolysate는 발암성이 강한 물질⁷⁻¹⁰⁾로 알려져 있다. 따라서 우리의 생활에서도 환경 오염 및 가공 식품의 영향으로 변이원의 섭취는 더욱 더 증가할 것으로 보인다.

암의 원인이나 메커니즘에 관해서 아직까지는 확실히 밝혀지지는 않았지만 우리가 일상 생활 속에서 섭취된 발암성 물질과 변이원이 직접 또는 간접적으로 DNA분자에 작용해서 손상을 주는 것이 원인이 되어 돌연변이를 일으키는 것으로 추정¹¹⁾되고 있다. 최근 다양한 식품 소재에 함유된 변이원성 억제 물질에 대한 연구가 진행되고 있으며 탄닌^{12,13)}, polyphenol^{14,15)}, 비타민^{16,17)}, 지질¹⁸⁾, 단백질¹⁹⁾, 아미노산²⁰⁾, 식이 섬유²¹⁾ 등이 알려지고 있다. 그러나 우리가 주식으로 섭취하고 있는 쌀에 대해서는 식량 자원의 의미가 강조되어 식감, 영양 등의 향상을 목적으로 주로 가공적성에 관하여 조사되었을 뿐, 쌀의 항암 효과 및 돌연변이 억제 효과에 대한 연구는 거의 없다. 특히 쌀의 항암 효과와 관련하여, 미국 NCI(National Cancer Institute)의 designer food program에서 현미와 미강의 항암 효과가 확인²²⁾되었으며, 국내에서는 일부 암 환자들이 민간요법으로 현미식을 하고 있다. 그러나 민간요법인 경우 과학적 구명이 없이 경험적으로만 이루어지고 있으며, 효능을 확인한 연구에서도 효능 검색에 대한 단편적인 보고만 있을 뿐, 억제 원인, 물질 분리, 임상 효과 등에 대해서는 거의 연구되지 않았다. 변이원성 억제 효과에 대해서도 곡류를 조리하였을 때 쌀의 용매 추출물에서 변이원성이 발견되지 않았다는 결과²³⁾와 미강 용매 추출물의 변이원성 억제 등 단편적인 보고²⁴⁾만 있을 뿐, 억제 물질의 분리와 작용 방식 및 생체내 활성 등은 거의 연구되지 않았다.

쌀의 성분은 대부분이 전분질로써 항변이 활성등의 생리 활성 물질이 다량으로 존재할 가능성은 낮지만 주식으로써 매일 다량으로 섭취하는 식품이기 때문에 일상적인 섭취에 기인하는 지속적인 효과는 변이원성 물질에 의한 체내 암 발생을 초기에 억제하는데 효과적일 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 주식으로써 중요한 쌀에 관하여 주로 섭취하는 형태인 현미와 백미로 나누어 조리 중 발생하기 쉬운 변이원인 tryptophan pyrolysate등의 변이원을 중심으로 억제 활성을 확인하고 비교함으로써 식품에의 응용을 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

연구 내용 및 방법

1. 연구 재료

1) 재료

쌀은 농촌진흥청 작물시험장에서 재배된 1994년도 산 장려품종으로써 일반계의 일품벼를 주로 사용하였다.

2) 시약

돌연변이원으로써 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol(Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol(Trp-P-2)는 Wako Co.(Japan)로부터 구입하였으며, 기타 모든 시약은 특급품 이상을 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 쌀 추출물의 조제

벼를 제현기(Satake rice machine, Japan)를 이용하여 왕겨를 분리시켜 현미를 만들고 현미를 다시 도정기(Satake grain testing mill, Japan)로 도정하여 백미시료(도정률 88.1%)를 만들어서 분쇄기(cyclotec 1903 sample mill, Sweden)를 이용하여 60 mesh로 분

쇄한 후 메탄올을 백미 중량의 10배(w/v)로 넣고 rotary shaker를 이용하여 25°C에서 회전 속도 200rpm으로 하룻밤 추출하였다. 이 추출물을 여과지(Toyo No.1)로 여과한 후 감압농축한 다음 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 고형물을 희석하여 4°C에 보관하면서 돌연변이 억제 시험에 사용하였다.

2) 돌연변이 억제 효과

Salmonella typhimurium reversion assay

Maron과 Ames²⁵⁾의 방법에 따라 preincubation test를 이용하여 쌀 추출물의 돌연변이 억제 효과를 조사하였다.

즉 멸균된 cap tube에 4% S-9 mix 0.5ml와 쌀 추출물 0.1ml, 돌연변이원 0.1ml, nutrient broth에서 하룻밤 배양된 균주 0.1ml(1~2×10⁸cells/ml)를 넣고 가볍게 Vortex한 후 37°C에서 20분간 예비 배양하였다. 다음 45°C의 top agar를 2ml씩 첨가하고 Vortex한 후 미리 제조된 글루코스 한천 평판 배지(minimal glucose agar plate) 위에 골고루 도말하여 37°C에서 48시간 배양 후 복귀 콜로니(revertant)의 수를 측정하였다. 이 때 첨가된 돌연변이원의 농도는 사용한 균주에 대하여 독성을 나타내지 않는 농도로써 Trp-p-1의 경우는 1μg/plate, Trp-p-2는 0.1μg/plate로 하였다. 각 실행마다 3개의 평판을 사용하였다. 이 때 쌀 추출물의 돌연변이 억제 효과(inhibition rate)는 [(a-b)/(a-c)×100]으로 나타내었는데 여기서 a는 돌연변이원만 있을 때 복귀 콜로니수, b는 쌀 추출물과 돌연변이원을 동시에 첨가하였을 때 복귀 콜로니수, c는 돌연변이원 및 쌀 추출물 모두 없는 경우의 복귀 콜로니의 수이다.

2) 통계 처리²⁶⁾

본 실험의 결과는 각 실험군별로 평균과 표준 편차로 나타내었고 SAS program을 이용하여 평균값의 유의성 검증은 T-test를 이용하여 살펴보았다.

연구 결과 및 고찰

1. 쌀 추출물의 돌연변이원성

쌀의 돌연변이 억제 활성을 조사하기 전에 먼저 쌀의 돌연변이원성 유무를 검토하고자 *S. typhimurium* reversion assay로 살펴 본 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

그 결과 모든 농도에서 음성 대조군보다 낮은 복귀 콜로니수를 보이거나 비슷한 복귀 콜로니수를 나타내었다. 따라서 쌀 추출물의 돌연변이 유발 효과는 없는 것으로 판단되었다.

2. 현미 및 백미의 돌연변이 억제 효과 비교

쌀을 현미와 백미로 나누어 제조한 시료를 메탄올로 추출하여 각각의 추출 수율을 알아본 결과는

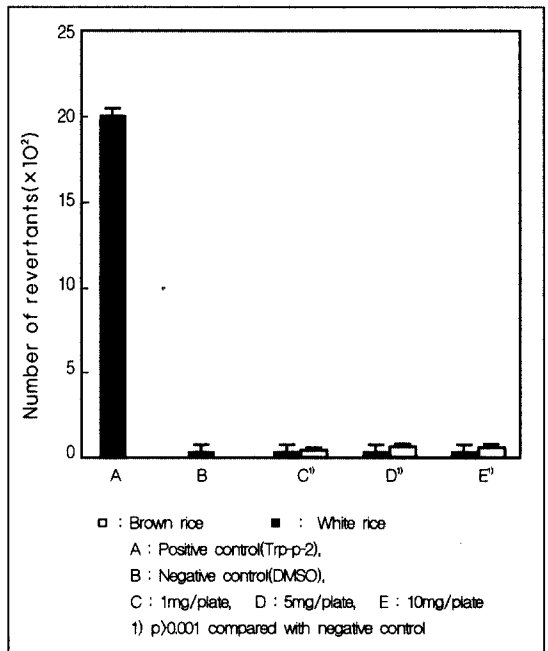


Fig. 1. Mutagenicity of the methanol extract of brown rice and white rice by the *S. typhimurium* reversion assay

Table 1과 같다. 그 결과 현미 2.5g/100g rice, 백미 1.0g/100g rice로 현미가 백미보다 다소 높은 수율을 나타내었다.

현미 및 백미(일품벼)의 돌연변이 억제 효과를 비교한 것은 Table 2, 및 Fig. 2와 같다. 즉 트립토판의 열분해(pyrolysis)를 통해 생성되는 물질로써 hepatic S₀ system에 의해 활성화되어 돌연변이를 나타내는 Trp-p-1 및 Trp-p-2에 의해 유발된 변이에 대한 억제 효과는 현미 및 백미 거의 모두 90% 이상의 강한 억제 효과를 보여주었다. 현미는 각각 95.4%, 89.9%이었고 백미는 96.0%, 91.0%로 강한 돌연변이 억제 활성을 보였으며 돌연변이 억제 효과에 있어서 현미와 백미의 메탄올 추출물간에는 유의적인 차이가 없었다(p>0.05).

이상의 결과에서 현미, 백미 모두 변이원 Trp-p-1, Trp-p-2에 대해서 억제 효과가 높게 나타나 우리가 주식으로 섭취하고 있는 쌀에서도 돌연변이 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러나 이러한 결과는

Table 1. Yield of rice with MeOH extraction

	Extraction yield ¹⁾
Brown rice	2.5
White rice	1.0

1) Amount of extracts(g)/100g rice × 100

Table 2. The comparison of inhibitory effect¹⁾ on chemically induced mutagenesis between brown and white rice methanol extract

	Number of revertants	
	Trp-p-1 ²⁾	Trp-p-2 ²⁾
Positive control	3486 ± 226	2181 ± 234
Spontaneous	37 ± 3	37 ± 3
Brown rice	196 ± 39(95.4%) ^{NS3)}	320 ± 17(89.9%) ^{NS}
White rice	176 ± 6(96.0%) ⁴⁾	286 ± 33(91.0%)

1) Inhibitory effect was assayed by *S. typhimurium* TA 98.

2) Trp-p-1(1 μg/plate) and Trp-p-2(0.4 μg/plate) with metabolic activation was used as positive control.

3) NS : not significant. There was no significant differences between brown and white rice methanol extracts in inhibitory effect on Trp-p-1 and Trp-p-2.

4) Values in parentheses indicate inhibition rate.

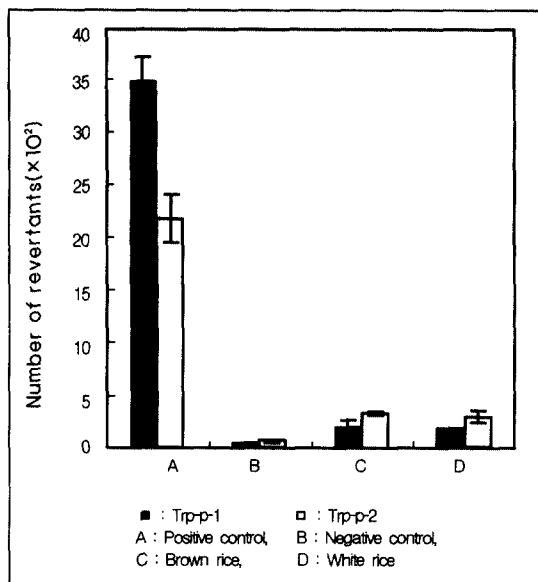


Fig. 2. Inhibitory effect of methanol extracts from brown and white rice on the mutagenicities induced by tryptophan pyrolysates in *S. typhimurium* reversion assay

시료를 모두 10mg/plate 농도에 맞추어 억제 효과를 비교하였기 때문에 나타난 결과로 생각되며 현미가 백미에 비해 약 2~3배 추출 수율이 높다는 것을 고려하면 실제로 활성을 나타내는 물질은 현미에 더 많이 함유되리라고 사료된다.

현미의 경우, 미강에는 페놀성 물질, 식이 섬유, 불포화 지방산, 비타민 및 항산화 물질 등 생리 활성 기능을 갖는 물질들이 존재하여 콜레스테롤 저하 효과, 혈압 상승 억제 등의 기능을 나타내는 것으로 보고²⁾되고 있어 이들 기능성 성분에 의한 돌연변이 억제 활성을 기대할 수 있을 것이다. 그러나 백미의 경우 대부분이 전분질로 구성되어 있어 기능성 성분이 존재함이 낮음에도 불구하고 돌연변이 억제 활성이 높게 나타난 것은 매우 흥미로운 결과라 사료된다.

3. 용량-반응 관계

쌀의 메탄올 추출물의 돌연변이 억제 효과에서 백

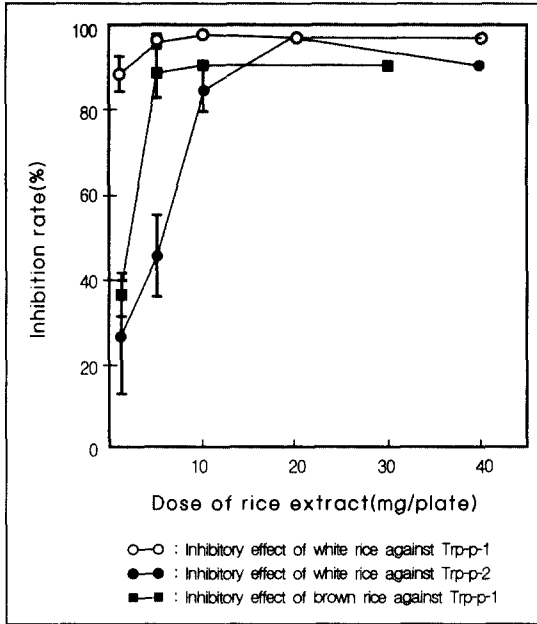


Fig. 3. Dose-response of methanol extract from brown and white rice against the mutagenicity induced by Trp-p-1 and Trp-p-2 in *S. typhimurium* reversion assay

미, 현미 추출물 모두에서 활성이 강한 것으로 나타나 백미, 현미 추출물에 대한 농도-반응 관계를 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다.

위 실험의 결과로부터 농도가 10mg/plate까지는 비례적으로 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 모두 일정 수준을 유지하며 90% 이상의 높은 억제 활성을 보여주었다.

이²⁰⁾ 등에 따르면 들깨잎 추출물의 aflatoxin B₁, Trp-p-2 및 benzo(a)pyrene에 대해서 10% 첨가시 80% 이상의 높은 효과가 있다고 보고하였고, 권²⁰⁾ 등은 고추로부터 aflatoxin과 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine의 변이원의 실험에서 5% 첨가시 50% 정도의 효과가 있다고 보고하였다. 이러한 연구 결과로부터 쌀 추출물의 돌연변이 억제 효과는 항돌연변이성을 나타내었다고 보고되고 있는 다른 천연물들과 비교해 볼 때 비교적 활성이 높은 것으로 생각된다. 또한 쌀은 매일 다량으로 섭취하므로 일상적

인 섭취에 기인하는 지속적인 효과를 나타낼 수 있어서 실제 효과가 더 클 수 있을 것이다.

결론 및 제언

본 연구에서는 쌀 추출물의 항돌연변이 효과를 확인하기 위해 조리 중 발생하기 쉬운 변이원인 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol(Trp-P-1)과 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol(Trp-P-2)에 대한 현미 및 백미의 메탄올 추출물의 억제 효과를 *Salmonella typhimurium* reversion assay로 조사하였다. 그 결과 Trp-p-1 및 Trp-p-2에 의해 유발된 변이원에 대한 억제 효과는 현미 및 백미 거의 모두 90% 이상의 강한 억제 효과를 보여주었다. 현미 및 백미의 메탄올 추출물은 농도가 증가함에 따라 돌연변이 억제 효과가 증가하였으나, 농도가 10mg/plate 이상에서는 억제 효과가 약 90%로 일정하였다. 백미와 현미간의 돌연변이 억제 효과에 있어서 백미와 현미의 메탄올 추출물간에는 유의적인 차이가 없었다($p > 0.05$).

이상에서 우리가 주식으로 섭취하고 있는 쌀에 대한 돌연변이 억제 물질의 존재를 확인하였으며 계속해서 돌연변이 억제 물질의 분리, 정제 및 활성 물질의 구조 분석에 관한 실험이 지속되어야 할 것이다.

또한 쌀과 비교하여 기타 주식의 성격인 곡류에 대한 돌연변이 억제 활성 물질의 존재를 조사함으로써 함량 활성을 갖는 이상적인 식품의 구성을 실험적 근거를 바탕으로 구체적으로 제시하고 단기적 치료 목적으로 하는 의약품과는 비교하여 일상적이며 장기적으로 섭취하는 식품의 돌연변이 억제 활성 및 함량 효과에 대한 지속적인 연구가 있어야 할 것이다.

참고문헌

1. 김광언, 한국 식생활에서의 쌀의 역사와 문화, 한국식문화학회지, 7:175, 1992.
2. 최춘언, 현대산업화와 식생활문화, 한국식문화

- 학회지, 10:213, 1995.
3. 황춘선, 박모라, 양이선, 중년기의 식습관 및 기호가 건강 상태에 미치는 영향, 한국식문화학회지, 6:351, 1991.
 4. 박동연, 한국 성인의 영양 개선과 영양 관련 질병의 감소를 위한 영양 교육 계획, 한국영양식량학회지, 22:154, 1993.
 5. 보건사회부, 보건사회 통계연보, 1991.
 6. Doll, R., The Lessons of life : Keynote address to the nutrition and cancer conference, *Cancer Res.*, 52:2044s, 1992.
 7. Namiki, M., Chemistry of Maillard reactions : Recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens, *Adv. Food Res.*, 32:115, 1988.
 8. Kuratsune, M., Benzo[a]pyrene content of certain pyrogenic materials, *J. Natl. Cancer Inst.*, 16:1485, 1956.
 9. Sugimura, T., Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process, *Mutat. Res.*, 150:33, 1985.
 10. Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosugo, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y., & Itai, A., Mutagenic principles in tryptophan and phenylalanine Pyrolysis product, *Proc. Japan Acad.*, 53:58, 1977.
 11. Swenson, D. H., & Kadlubar, F. F., Properties of chemical carcinogens in relation to their mechanisms of action, In *Microbial Testers*, 1981.
 12. Kim, S. H., Kim, J. O., Lee, S. H., Park, K. Y., Park, H. J., & Chung, H. Y., Antimutagenic compounds identified from the chloroform fraction of galic(*Allium Sativum*), *J. Korean Soc. Food Nuri.*, 20:253, 1991.
 13. Kada, T., Kaneko, K., Masuzaki, S., Matsuzaki, T., & Hara, Y., Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens, a case of green tea factor, *Mutat. Res.*, 150:127, 1985.
 14. 여생규, 안철우, 이용우, 이태기, 박용호, 김선봉, 녹차, 우롱차 및 홍차 추출물의 돌연변이원생 억제 작용, 한국영양식량학회지, 24:160, 1995.
 15. 이정희, 이서래, 식물성 식품 중 페놀성 물질의 몇 가지 생리 활성, 한국식품과학회지, 26:317, 1994.
 16. Arroyo, P. L., Hatch-Pigotto, V., Mower, H. F., & Cooney, R. V., Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants, *Mutat. Res.*, 281:193, 1992.
 17. Busk, L., Ahlberg, U. G., & Albanus, L., Inhibition of protein pyrolysate mutagenicity by retinol(Vitamin A), *Food Chem. Toxicol.*, 20:535, 1982.
 18. Ho, T. A., Aldridge, A. J., & Rawland, I. R., Effect in vitro of arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on the hepatic activation of dietary genotoxins by rat post-mitochondrial fractions, *Food Chem. Toxicol.*, 30:853, 1992.
 19. Limsylianco, C. Y., Guevara, A. P., Syliano, W. L., Serrame, E., & Mallarca, R., Antigenotoxic effects of coconut meat, coconut milk and coconut water, *Philippine J. Sci.*, 121:231, 1992.
 20. Karo, T., & Kikugawa, K., Proteins and amino acids as scavengers of nitrite, inhibitory effect on the formation of nitroso dimethylamines and diazoquinone, *Food Chem. Toxicol.*, 30:617, 1992.
 21. Morita, K., Nishijima, Y., & Kata, T., Chemical nature of a desmutagenic factor from Burdock, *Agric. Biol. Chem.*, 49:925, 1985.
 22. Haumman, B. F., Designing manipulating foods to promote health, *Inform.*, 4, 344(1993).
 23. Mataka, M., Takurna, N., Takebayashi, I., Hyeta, M., & Ohnishi, Y., Mutagenicity of market basket

- samples for total diet study, J. Food Hyg. Soc. Japan, 28:336, 1987.
24. Suwa, Y., Kobayashi, T., Kiyota, N., & Yoshizumi, H., Antimitagenic agent and method of inactivating the mutagenicity of food and beverages by using said agent, European Patent Application, 1984.
25. Maron D. M., & Ames B. N., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutat. Res., 113:173, 1983.
26. SAS Institute Inc., SAS user's guide, SAS Institute Inc., Cary, NC., 1988.
27. Mashall, W., & Wadsworth, J., Rice Science and Technology, pp.421, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994.
28. 이경임, 이숙희, 김정옥, 정해영, 박건영, 들깨잎 추출물의 항돌연변이 및 항산화 효과, 한국영양 식량학회지, 22:175, 1993.
29. Kweon, Y. M., Rhee, S. H., & Park, K. Y., Antimutagenic effects of juices from the peppers in Salmonella Assay System, J. Korean Soc. Food Nutr., 24:440, 1995.