

市販 天然色素의 Salmonella typhimurium에 대한 發育抑制 效果에 關한 調査

食品衛生科, 細菌科*

韓仙嬭 · *朴錫基 · 金卜順 · 趙南俊 · 李圭男

Inhibition Effect of Natural Food Coloring on the Growth of Salmonella typhimurium.

Food Sanitation Division, Bacteriology Division.*

Han Sunhee, Park Seoggee*, Kim Boksoon, Chough Namjoon, Lee Kyunam

=Abstract=

We took 4 kinds of natural food colorings imported as samples and investigated the inhibition effect of them on the growth of Salmonella typhimurium TA 98, 100, 1535, 1537 & 1538.

There was no significance between the number of revertant colonies on the medium with histidine and on the medium without histidine and also among TA 1535, 1537 & 1538.

Safflower Yellow effectively inhibited Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100.

Curcumin San-Ei, Annato San-Ei and San Red No.1 had no inhibition effect on the growth of Salmonella typhimurium.

It was effective for 50-100ppm of Safflower Yellow effectively inhibited Salmonella typhimurium TA 98.

序 論

合成色素에 의한 發癌性과 突然變異原性(赤色 104號)이 證明된 이후 天然色素에 關한 관심과 使用量은 날로 增加되고 있는 실정이다.

天然色素의 原料로서는 果實, 根(뿌리), 꽃, 葉 等의 植物性의 것 以外에 昆蟲, 微生物 等이 利用되고 있으며, 原料種類도 每年 增加되고 있고, 또한 開發, 研究되고 있으나, 天然色素의 安全性에 對해서는 전혀 規制되고 있지 않으며 食品製造業者의 表示義務도 없 는 실정이다.³⁾ 그러나 河⁴⁾等은 1977年 Ames等이 開發한 Salmonella菌을 利用한 突然變異原性 試驗에서 Annate, Cochineal은 陽性을 나타냈다고 報告하였고, Caramel의 경우는 河⁴⁾, Nagao⁵⁾ 等이 S-9 mix를 使用하여 實驗한 結果, 代謝에 不必要한 突然變異原性物質이 있음을 報告하였다. 또한, 天然色素의 主成分이

되는 flavone 化合物中에서도 많은 種類가 突然變異性을 나타냄을 Brown⁶⁾⁷⁾ 等은 報告한 바 있다.

따라서 著者等은 國內에 輸入되어 市販되고 있는 天然色素中 4種의 色素를 選別하여 Salmonella typhimurium에 對한 發育抑制 效果를 調査하므로써 天然色素의 突然變異原性에 對한 基礎資料를 삼고자 本 實驗을 實施하였다.

試驗材料 및 方法

1. 供試菌株⁸⁾⁻¹⁷⁾

實驗에 使用한 菌株는 Sal. typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538. 菌株는 histidine 要求性이 강한 突然變異菌株로서 化學物質等의 變異誘發物質에 쉽게 revertant mutation되어 histidine 要求性이 喪失되는 것으로 標準화된 菌株이다. 이 中 TA 98, TA 1537, TA 1538을 frame shift突然變異가,

Table 1. Minimal glucose medium

A. Salt mixture (20X)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	10g
KH ₂ PO ₄	100g
Na ₃ -citrate	5g
KOH	25g
H ₂ O	500ml
adjust PH7.0 with KOH	
B. MgSO ₄ 7H ₂ O	10%
C. 20X Salt mixture	
glucose	5g
agar	15g
Distilled water	1,000ml

TA 100, TA 1535는 one point突然變異가 쉽게誘導되는菌株이다.^{15)~23)}

2) 培地

가) nutrient medium

나) 最少 glucose 培地

最少 glucose培地는 table 1. 과 같이 salt mixture(A)를 만들고 B와 C를 高壓蒸氣滅菌하여 C에 B를 1ml 가한 다음, 平板培地 製造時에 直徑 100mm petridish 에 20ml씩 分注하여 하룻밤 室溫에 放置한후 使用하였다(Table 1. 참조).

다) Top Agar.

Agar 0.6%와 NaCl 0.5%의 비율로 水溶液을 만든 다음, 1mM L-histidine과 1mM biotin을 同量 混合하여 만든 0.5mM histidine-biotin 용액을 10 : 1 (Agar; 0.5mM histidine-biotin)로 混合한 후 121°C 5분간 滅菌 후 使用하였다.^{18)~30)}

3) 菌株의 特性確認^{16)~24)}

本 試驗에 使用한 Sal. typhimurium 菌株는 自然狀態에서 매우 쉽게 revertant mutation이 수시로 일어나므로 試驗 直前に 그 特性을 確認하였다.

가) histidine 要求性

試驗에 使用한 菌株의 histidine 要求性을 認證하기 위하여 最少 glucose 培地와 最少 glucose 培地에 0.5 mM histidine을 10 : 1로 섞은 his⁺ 培地 2種類로 만든 斜面培地에 菌을 接種하여 37°C에서 1~2日동안 培養하고 his⁺培地에서만 發育하는 것을 供試菌株로 使用하였고 實驗후에도 histidine 要求性을 再確認하였다.

나) 藥劑耐性 因子 R-factor plasmid 有無

菌株 TA100과 TA98은 R-factor를 가진 菌으로 이것을 認證하기 위하여 Nutrient agar에 菌을 接種, 10μg ampicillin disc에 넣어 37°C에서 1日동안 培養한 바, TA100과 TA98은 ampicillin耐性이 있었고, TA1535, TA1537, TA1538은 感受性이 있음을 認證하였고 實驗후에도 再確認하였다.

4) 試驗菌株의 浮遊液 製造.

試驗菌株는 Nutrient broth에 接種하여 37°C에서 16~18時間 振盪培養 後 McFarlant方法에 따라 菌濃도가 1~2×10⁸/ml가 되도록 하였다.

5) 供試 試料溶液

本 試驗에 使用한 市販天然色素는 Table. 2와 같이 이들 4種의 天然色素를 물에 溶解시켜 0.1N-NaOH 溶液으로 pH를 7로 中和한 후³¹⁾ 100ppm, 50ppm, 10ppm, 1ppm으로 만들어서 0.45μm milipore 여과기로 여과하여 使用하였다.

2. 試驗方法^{3)~30)}

試驗方法은 代謝活性化法에 의하지 않는 plate法에 의한 方法을 使用하였다.

즉, 멸균한 시험관에 희석한 試料溶液을 各各 1ml씩 加한 후 0.1M인산 나트륨 완충액(pH 7.4) 0.5ml와 試驗菌株 浮遊液을 0.1ml씩 加했다. 그 다음 60°C를 유지하는 top agar를 2ml씩 加해 즉시 잘 섞은 후 最少 glucose 培地위에 넣어 잘 펴고, top agar가 굳으면 37°C에서 48時間 培養하여 plate上的 試驗菌株의 生育沮害 有無를 현미경을 使用하여 調査하고 revertant mutation에 의하여 생긴 colony數를 計測하였다.

Table 2. Natural food colorings used in the experiment

No.	Commercial Name	Chemical Structure	Origion
1.	Curcumin San-Ei	Dihetone	Roots of <i>curcunia longa</i> L.
2.	Annato San-Ei	Carotenoid	Seeds of <i>Bixa oreleana</i> L.
3.	Safflower Yellow No. 2	Flavonoid	Flowers of <i>Carthamus tinctorius</i>
4.	San Red No. 1	Anthraquinone	Cochineal

結果 및 考察

試驗結果는 Fig. 1~4와 같다.

TA1535, 1537, 1538에 對한 his⁺ 培地와 最少 glucose 培地의 revertant colony 數에는 有意性이 없었다.

Safflower yellow의 경우는 Salmonella 發育抑制 效果가 있는 것으로 TA98, TA100에서 나타났다(Fig. 1, Fig. 2).

이러한 結果는 安井³¹⁾ 등의 試驗結果와 一致하는 것

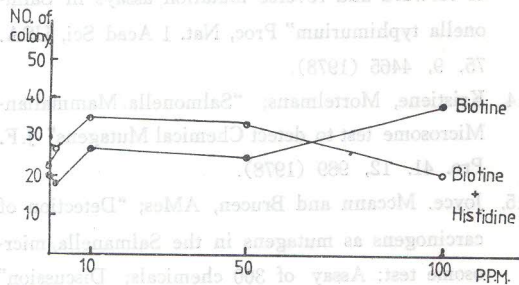


Fig. 1. Revertant colony curve of Safflower yellow in TA 98.

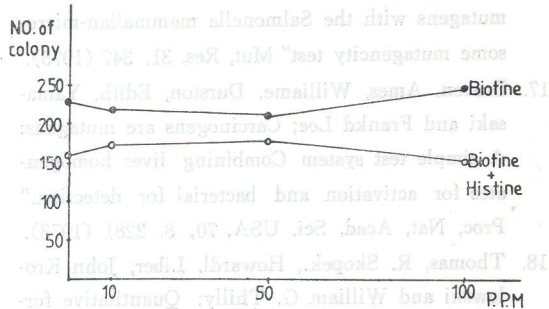


Fig. 2. Revertant colony curve of Safflower Yellow in TA 100.

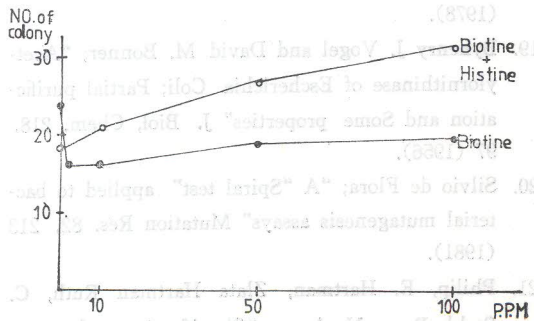


Fig. 3. Revertant colony of Annato San-Ei in TA98.

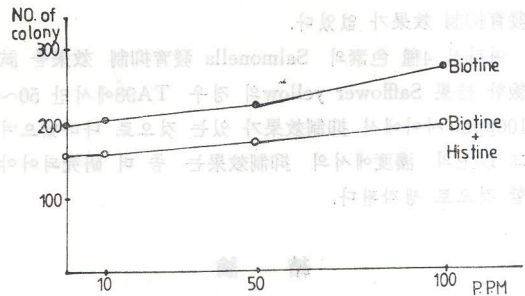


Fig. 4. Revertant colony of Annato San-Ei in TA 100.

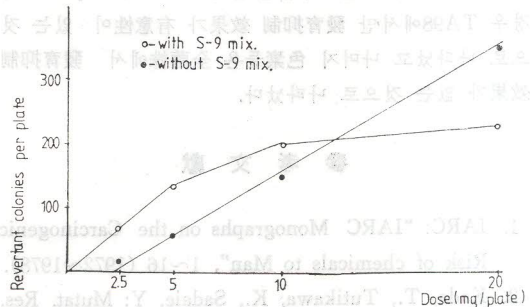


Fig. 5. Dose response curve of mutagenicity of Safflower Yellow in TA 100.³¹⁾

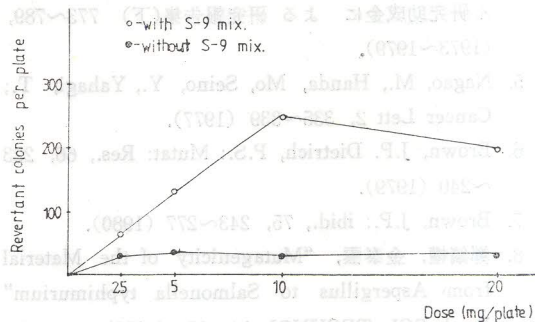


Fig. 6. Dose response curve of mutagenicity of Safflower Yellow in TA98.³¹⁾

으로써 Fig. 5³¹⁾, Fig. 6³¹⁾에서 보듯이 S-9 mix를 넣은 代謝活性化法, plate 方法에서도 TA98과 TA100에서 變異原性を 나타낼을 알 수 있었다.

Safflower yellow는 紅花에 含有된 黃色色素의 混合物³²⁾로서 flavonoid 種의 Calcone 系의 構造를 갖는 天然色素로서 물로 抽出된 製品이 과자, 장류, 단무지 등에 널리 사용되고 있는 것으로 알려져 있다.³³⁾

Annato San-Ei의 結果로서 TA98, TA100에서 발육

억제 효과는 有意性이 없는 것으로 나타났다.

Curcumin San-Ei와 San Red No. 1은 全菌株에서 發育抑制 效果가 없었다.

따라서 4種 色素의 Salmonella 發育抑制 效果를 試驗한 結果 Safflower yellow의 경우 TA98에서만 50~100ppm 사이에서 抑制效果가 있는 것으로 나타났으며 그 以上の 濃度에서의 抑制效果는 좀 더 研究되어야 할 것으로 생각된다.

結 論

市販되고 있는 4種의 天然色素에서의 Sal. typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538에 對한 發育抑制 效果를 시험한 結果 Safflower yellow의 경우 TA98에서만 發育抑制 效果가 有意性이 있는 것으로 나타났고 나머지 色素들은 全菌株에서 發育抑制 效果가 없는 것으로 나타났다.

參 考 文 獻

1. IARC: "IARC Monographs on the Carcinogenic Risk of chemicals to Man", 1~16 (1972~1978).
2. Kada, T., Tutikawa, K., Sadaie, Y: *Mutat, Res.* 16, 165~174 (1972).
3. 厚生省食品化學 レポートシリーズ No. 1 (1979).
4. 河内卓, 賀田恒夫, 西岡一, 矢作多貴江: 厚生省がん研究助成金による 研究報告集(下) 773~789, (1973~1979).
5. Nagao, M., Handa, Mo, Seino, Y., Yahagi, T.; *Cancer Lett* 2, 335~339 (1977).
6. Brown, J.P. Dietrich, P.S.: *Mutat: Res.*, 66, 223~240 (1979).
7. Brown, J.P.: *ibid.*, 75, 243~277 (1980).
8. 鄭鎬權, 金泰雲, "Mutagenicity of the Material from Aspergillus to Salmonella typhimurium" *Food. SCI. TECHNOL* 14, 67, (1982).
9. BRNCEN, A., FRANKD, L., and Williame Durston; "An Improved Bacterial Test system for the detection and Classification of mutagens and Carcinogens". *Proc Nat Acad Scic USA.* 70. 3. 782 (1973).
10. Joyce, Mccann, Nell, E., Spingarn, Joan KoBori, and Bruce A.; "Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial tester strains with R factor Plasmids." *Proc. Nat. Scic, USA* 72. 3. 979 (1975)
11. S. de Flora, R. Coppola, P. Zancchi and C. Bennicelli; "Reversal of sodium-azide Mutagenicity by liver preparations and by Gastric juice" *Mut. R.* 61. 387 (1979).
12. Christel Neut, Jayant Pathak, Charles Romond and Henri Beerens; "Rapid detection of Clostridium Perfringens; Comparison of lactose sulfite broth with tryptose sulfite-cycloserine agar" *J, Assocof-anal, C.* 68. 5 (1985).
13. Thomas, R., Skopek, Howardl, Perra A. Kaden, and William G., Thilly; "Relative sensitivities of forward and reverse mutation assays in Salmonella typhimurium" *Proc, Nat. 1 Acad Sci, USA.* 75, 9, 4465 (1978).
14. Kristiene, Mortelmans; "Salmonella/Mammalian-Microsome test to detect Chemical Mutagens" *J.F. Pro.* 41. 12, 989 (1978).
15. Joyce. Mccann and Bruce, AMes; "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals; Discussion" *Pro, Nat, Acad, Sci, USA.* 73. 3, 950 (1976).
16. Bruce. Ames, Joyce. Mccann and Edith, Yamasaki; "Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test" *Mut, Res,* 31, 347 (1975).
17. Bruce. Ames, Williame. Durston, Edith, Yamasaki and Frankd Lee; *Carcinogens are mutagens: A simple test system Combining liver homogenates for activation and bacterial for detection.* *Proc, Nat, Acad, Sci. USA.* 70, 8, 2281 (1973).
18. Thomas, R. Skopek., Howardl. Liber, John Krolewski and William G. Thilly; *Quantitative forward mutation assay in Salmonella typhimurium using 8 azag-uanine resistance as a genetic marker.* *Proc. Nat.1 Acad Sci, USA,* 75, 1, 410 (1978).
19. Byhenry J. Vogel and David M. Bonner; "Acetylornithinase of Escherichia Coli; Partial purification and Some properties" *J. Biol, Chem.* 218. 97 (1956).
20. Silvio de Flora; "A "Spiral test" applied to bacterial mutagenesis assays" *Mutation Res.* 82, 213 (1981).
21. Philip, E. Hartman, Zlata Hartman Ruth, C. Stahl, Bruce N. Ames; "Classification and mapp-

- ing of spontaneous and induces mutations in the histidine operon of salmonella." *Advanced in Genetics*. 16, 1 (1971).
22. F.C. Wehner, P.G. Thiel, S.J. Van Rensburg and Ingrid P.C. Demasins; "Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus Penicillium* mycotoxins." *Mut. Res.* 58, 193 (1978).
 23. Joyce Mccann Edmund, Edith Yamasaki, and Bruce Ames; "Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome; Assay of 300 chemicals" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72, 5135, (1975).
 24. Bruce Ames; "The salmonella/microsome test for detection of carcinogens as mutagens." *Federation Proc.* 36, 5 (1977).
 25. Frederick J. De Serres, Michael D. Shelby; "The Salmonella mutagenicity Assay: Recommendation," *Sci*, 203, 9 (1979).
 26. Tong-Manang, M.M. Shahin; "Mutagenic and recombinogenic activities of the food additive furylfuramide in eukaryotes." *Sci* 184 1086 (1974).
 27. D.G. Macphree; "DNA polymerase activity determined by the ultraviolet-protecting plasmid R-Utrecht", *Nature.* 251, 4, 432 (1974).
 28. Helmut Bartsch, Christian Malaveille, Ruggero Montesano, Lorenzo Tamatis; "Tissue-mediated mutagenicity of vinylidene chloride and 2-chlorobutadiene in salmonella typhimurium." *Nature*, 255, 19, 641 (1975).
 29. Silvio de Flora; "Metabolic deactivation of mutagens in the Salmonella microsome test." *Nature.* 271. 455 (1978).
 30. 労働省労働基準局化学物質調査課; "微生物を用いる変異原性試験 'ガイドライン' の解説" (64).
 31. Yohko, Y. Nobuyuki, T., Nobuko H., and Yonetash, T., "Mutagenicity of Commercial Natural Food color, 食衛誌, 23, 86~90 (1981).
 32. 小原平太郎ら: 第19回 天然有機化合物討論会講演要旨集 p.380 (1975).
 33. 谷村顯雄, 片山脩; 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司 "天然着色料ハンドブック" p.265 (1979).

編 譯