

ผลของสารสกัดจากเห็ดบางชนิดต่อการเหนี่ยวนำการก่อกลายพันธุ์แบบ Somatic Mutation and
Recombination ด้วยยูรีเทนในแมลงหวี่สายพันธุ์ *Drosophila melanogaster*



นางสาวอุมมาพร สุวีรพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974- 14- 3374- 3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF SOME MUSHROOM EXTRACTS ON URETHANE INDUCED
SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION IN *Drosophila melanogaster*

Miss Umaporn Suweeraporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Food Chemistry and Medical Nutrition

Department of Food Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-3374-3

อุมาพร สุวีระพร: ผลของสารสกัดจากเห็ดบางชนิดต่อการเหนี่ยวนำการก่อกลายพันธุ์แบบ Somatic Mutation and Recombination ด้วยยูรีเทนในแมลงหวี่สายพันธุ์ *Drosophila melanogaster*. (EFFECT OF SOME MUSHROOM EXTRACTS ON URETHANE INDUCED SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION IN *Drosophila melanogaster*) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.ลินนา ทองยงค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ 110 หน้า. ISBN 974-14-3374-3

ศึกษาผลของสารสกัดจาก *Agaricus bisporus* (เห็ดแชมปิญองหรือเห็ดกระดุม), *Lentinus edodes*(เห็ดหอม), *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) และ *P.abalonus* (เห็ดเป่าฮื้อ) ต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ซึ่งเหนี่ยวนำโดยใช้สารยูรีเทนในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ใน 3 สภาวะ คือเห็ดสด เห็ดลวก และเห็ดดอง การศึกษาผลของหนอนที่ได้รับสารพิษและอาหารพร้อมกัน (simultaneous feeding study) โดยการย้ายหนอนแมลงหวี่อายุ 3 วันที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงหวี่ตัวเมียสายพันธุ์ Oregon wing hair flare กับแมลงหวี่ตัวผู้สายพันธุ์ Multiple wing hair strain ในอาหารปกติ ไปเลี้ยงในอาหารตัวอย่างหรืออาหารตัวอย่างผสมกับยูรีเทนความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่การศึกษาผลของหนอนแมลงหวี่ที่ได้รับอาหารตัวอย่างตั้งแต่แรกเกิด (pre-feeding study) ทำโดยให้แมลงหวี่ตัวเมียและตัวผู้ผสมกัน ในอาหารที่มีผลิตภัณฑ์จากเห็ดชนิดต่างๆ เมื่อหนอนอายุครบ 3 วัน จึงย้ายหนอนไปเลี้ยงในอาหารปกติที่มียูรีเทน (การทดสอบแบบที่ 1) หรืออาหารตัวอย่างชนิดเดิมที่มียูรีเทน (การทดสอบแบบที่ 2) จนกระทั่งหนอนกลายเป็นแมลงหวี่จึงทำการวิเคราะห์ชนิดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นบนปีกมวน ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่เตรียมจากเห็ดชนิดต่างๆไม่มีพิษและฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เมื่อผสมตัวอย่างในอาหารเลี้ยงแมลงหวี่พร้อมกับยูรีเทนมีเพียงสารสกัดเห็ดหอมสดและดอง, เห็ดนางรมสดและดองเท่านั้นที่สามารถทำให้การก่อกลายพันธุ์ที่เกิดในแมลงหวี่ลดลงส่วนตัวอย่างอื่นไม่มีผลลดฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ แต่เห็ดกระดุมสดและลวกมีผลเพิ่มฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในแมลงหวี่ จากการศึกษาจึงอาจตั้งสมมติฐานได้ว่า ในการดองมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบในเห็ดทำให้เกิดสารที่สามารถป้องกันการก่อกลายพันธุ์โดยการกระตุ้นการทำงานของ glutathione-S-transferase หรืออาจทำให้การทำงานของ cytochrome P-450 ลดลง หรือเกิดจากผลของ lactic acid bacteria ที่เกิดขึ้นในกระบวนการดองที่มีผลในการทำลายสารพิษ ดังนั้นสารสกัดจากเห็ดดองจึงควรมีการศึกษาต่อไป ในการศึกษาผลของ Pre-feeding study สารสกัดเห็ดกระดุมสดในการทดลองแบบที่ 2 และสารสกัดเห็ดนางรมสด/ลวกในการทดลองแบบที่ 1 และ 2 พบว่าตัวอย่างดังกล่าวแสดงคุณสมบัติร่วมสนับสนุนการก่อกลายพันธุ์ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสารตัวอย่างไปมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำลายสารพิษจึงมีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ สิ่งที่น่าสนใจคือเห็ดดองมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ในทุกสารสกัด อาจเป็นผลจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กระตุ้นสารพิษหรือส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ทำลายสารพิษ

ภาควิชา อาหารเคมี.....
สาขาวิชา อาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์...
ปีการศึกษา 2548.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##:45766290: MAJOR FOOD CHEMISTRY

KEY WORD: ANTIMUTAGENICITY/ SMART/ MUSHROOM/ BUTTON/ SHIITAKE/ OYSTER/ ABALONE/ URETHANE

UMAPORN SUWEERAPORN: EFFECT OF SOME MUSHROOMS EXTRACTS ON URETHANE INDUCED SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION IN *Drosophila melanogaste*. THESIS ADVISOR: LINNA TONGYONK, D.Sc., KAEW KANGSADALAMPAI, Ph.D. 110 pp. ISBN 974-14-3374-3

The possible modulating effect of some mushrooms namely; *Agaricus bisporus* (button, เห็ดกระดุม), *Lentinus edodes* (Shiitake, เห็ดหอม), *Pleurotus ostreatus* (Oyster, เห็ดนางรม), and *P.abalonus* (Abalone, เห็ดเป๋าฮื้อ) in 3 conditions (fresh, blanching and fermentation) on mutagenicity induced by urethane in somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* was investigated. Three-day old trans-heterozygous larvae, obtained by mating virgin females of Oregon wing flare hair strain and males of multiple wing hair strain on standard medium, were transferred to sample medium and experimental medium (samples extracts plus urethane 20 mM) for the simultaneous feeding study. The virgin females and males designated in the pre-feeding study were mated on an experimental medium until the larvae were three-days old. Then they were transferred to positive medium and experimental medium as type II or I experiment respectively until they became adult flies. The round wings of all surviving flies were analyzed for the occurrence of mutant spots. It was found that all extracts were not toxic or mutagenic in both studies. In simultaneously feeding study, only fresh/ fermented shiitake and fresh/ fermented oyster mushroom reduced number of induced wing spots while the other extracts showed no effect. In contrast, fresh and blanched button mushrooms increased number of induced wing spots. It was proposed that some compounds obtained from biochemical changes during fermentation might activate glutathione-S-transferase activity or decrease the activity of cytochrome P-450 or lactic acid bacteria existed during fermentation process could retard the activity of any toxicants. Fermented mushroom extracts need to be clarified in further studies. Pre-feeding of three-day old larvae with fresh button mushroom in type II experiments and fresh/blanched oyster mushroom in both types I and II experiment increased the frequency of mutant spots. The possible mechanism might be the stimulation of cytochrome P-450 or inhibition of detoxification enzymes. Interestingly, the antimutagenicity of all fermented mushrooms was shown in pre-feeding study. It was proposed that the extracts might activate glutathione-S-transferase activity or decrease the activity of cytochrome P-450 enzymes.

Department Food Chemistry..... Student's signature..... *Umaporn*
 Field of study Food Chemistry and Medical Nutrition... Advisor's signature... *Linna Tongyongk.*
 Academic year 2005 Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to Assistant Professor Dr. Linna Tongyonk, my major advisor for valuable advice, suggestion, understanding and heart-felt encouragement throughout my graduate program.

Special appreciation is also extended to my co-advisors, Associate Professor Dr. Kaew Kangsadalampai for his kindness, comments and valuable suggestions.

My warmest thanks are extended to all my dear friends for their help, suggestion and encouragement throughout the study.

My utmost gratitude is also expressed to my family for their loves, cares, supports, understandings and much encouragements and assistances throughout the period of my graduate study that inspired me to reach my destination.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI).....	iv
ABSTRACT (IN ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENT.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
Objectives.....	3
Expected Research Outcome.....	3
II LITERATURE REVIEW.....	4
2.1 Health Aspects of Plants.....	4
2.2 Characteristics of Mushrooms.....	10
2.2.1 Button mushroom.....	10
2.2.2 Shiitake mushroom.....	10
2.2.3 Pleurotus mushroom.....	11
2.3 Medicinal Values of Mushrooms.....	14
2.3.1 Antimutagenicity and Antigenotoxic Effect.....	14
2.3.2 Antioxidant Properties.....	15
2.3.3 Antitumor Activities.....	16
2.3.4 Antibacterial Activities.....	16
2.4 Mutagenicity of Mushrooms.....	17
2.5 Food Preservation.....	20
2.5.1 Low- acid, Thermally process, Packaged in hermetically sealed container.....	20
2.5.2 Acidic Foods.....	21
2.5.3 Fermented Foods.....	21

2.5.4 Other Foods.....	24
2.6 Somatic Mutation and Recombination Test (SMART).....	25
2.6.1 Wing Spot Test in <i>Drosophila</i>	26
2.6.2 Approach of SMART.....	29
2.6.3 Application of Wing SMART Assay.....	29
2.6.4 Limitation of the Test.....	30
2.7 Standard Mutagens for Mutagenicity of SMART.....	31
2.7.1 Metabolic Activation and Detoxification of Urethane	31
2.7.2 Mutagenicity of Urethane.....	34
2.7.3 Alteration Mutagenicity of Urethane.....	34
III MATERIALS AND METHODS.....	37
3.1 Chemicals for SMART.....	37
3.2 <i>Drosophila</i> Tester Strain and Cross.....	37
3.3 Experimental Design and Sample Preparation.....	37
3.3.1 Sample Preparation.....	39
3.3.2 <i>Drosophila</i> Stock and Experimental Medium...	41
3.3.3 Preliminary Studies.....	42
3.3.4 Actual Studies.....	43
3.4 Wing Preparation.....	45
3.5 Data Evaluation and Statistical Analysis.....	48
IV RESULTS.....	50
4.1 Preliminary Study: Survival of Adult flies and Mutagenicity of Mushroom extracts.....	51
4.1.1 Survival of Adult flies.....	51
4.1.2 Mutagenicity of Mushroom extracts.....	62
4.2 Actual study: Mutagenic Modulation of Mushroom extracts.....	66
4.2.1 Simultaneous Feeding Study.....	66
4.2.2 Pre- feeding Study.....	71

V DISCUSSION.....	81
5.1 The Survival and Mutagenicity of the Extracts fed to <i>Drosophila</i> larvae.....	81
5.2 Mutagenic Modulation on Urethane of Mushroom extracts	82
VI CONCLUSION.....	87
REFERENCES.....	88
APPENDICES.....	105
BIOGRAPHY.....	110

LIST OF TABLES

TABLE	Page
1. Selected phytochemicals associated with cancer prevention.....	8
2. Nutrient composition of mushrooms (composition per 100 grams edible portion)	13
3. Carcinogenic effect of <i>A. bisporus</i> or phylyhydrazine derivatives.....	19
4. Biologically active compounds in kimchi.....	24
5. Survival data of adult flies fed on mutagenic testing mushroom extracts	52
6. Survival data of adult flies in simultaneous study obtained from 3- day old larvae (<i>mwh+/⁺flr³</i>) induced to the sample mediums and the experimental mediums	55
7. Survival rate of adult flies obtained from 100 larvae (<i>mwh+/⁺flr³</i>) pre-fed on each sample medium for 3 days and followed by the positive medium (type I experiment) and the experimental media containing 20 mM URE (type II experiment)..	59
8. Mutagenicity of mushroom extracts reported as wing spot induction on <i>Drosophila melanogaster</i> derived from 100 trans-heterozygous <i>mwh+/⁺flr³</i> larvae of the improved high bioactivation cross fed on mutagenic sample media.	63
9. Wing spot induction on <i>Drosophila melanogaster</i> derived from 100 trans-heterozygous <i>mwh+/⁺flr³</i> larvae of the improved high bioactivation cross fed on experimental media in simultaneous feeding study.	67

10. Wing spot induction in pre-feeding study of button mushroom extracts on *Drosophila melanogaster* derived from 100 trans-heterozygous $mwh^{+}/+flr^3$ larvae of the improved high bioactivation cross. 73
11. Wing spot induction in pre-feeding study of shiitake mushroom extracts on *Drosophila melanogaster* derived from 100 trans-heterozygous $mwh^{+}/+flr^3$ larvae of the improved high bioactivation cross. 75
12. Wing spot induction in pre-feeding study of oyster mushroom extracts on *Drosophila melanogaster* derived from 100 trans-heterozygous $mwh^{+}/+flr^3$ larvae of the improved high bioactivation cross. 77
13. Wing spot induction in pre-feeding study of abalone mushroom extracts on *Drosophila melanogaster* derived from 100 trans-heterozygous $mwh^{+}/+flr^3$ larvae of the improved high bioactivation cross. 79

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Button mushroom.....	10
2. Shiitake mushroom.....	11
3. Abalone mushroom.....	12
4. Oyster mushroom.....	12
5. The structure of mushroom hydrazines.....	18
6. Genetic schemes illustrating various ways of spot formation in the somatic mutation and recombination test	27
7. Marker mutations of wing surface to show clone of cuticle secreted by cells homozygous for multiple wing hairs	28
8. Schematic structures of urethane and its metabolites.....	32
9. Known and probable activation and inactivation pathways of metabolism of urethane	33
10. Overall investigations to elucidate the effect of mushroom samples..	38
11. Steps for sample preparations.....	40
12. Type of media for experiment.....	41
13. Mutagenicity test of the mushroom samples.....	43
14. Simultaneous administration study of the mushroom extracts.....	44
15. Pre- feeding study of the mushroom samples on mutagenicity of urethane in <i>Drosophila melanogaster</i> .	45
16. Normal half mesothorax showing the regions A- E of the wing surface scored for spots according to Graf <i>et al.</i> (1984)	46
17. Trichomes on the wing blade.....	47

LIST OF ABBREVIATIONS

h	hour
g	gram
μg	microgram
GST	glutathione-S-transferase
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
URE	urethane
FBM	fresh button mushroom
BBM	boiled button mushroom
PBM	pickled button mushroom
FSM	fresh shiitake mushroom
BSM	boiled shiitake mushroom
PSM	pickled shiitake mushroom
FOM	fresh oyster mushroom
BOM	boiled oyster mushroom
POM	pickled oyster mushroom
FAM	fresh abalone mushroom
BAM	boiled abalone mushroom
PAM	pickled abalone mushroom