ผลของเห็ดกินได้บางชนิดในการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำต้มเนื้อเข้มข้น ที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทโดยการทดสอบเอมส์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาววันวิสาข์ สบายใจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ภาควิชาอาหารเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTAGENIC MODIFICATION EFFECT OF SOME EDIBLE MUSHROOMS ON NITRITE TREATED BEEF CONCENTRATE USING AMES TEST

Miss Wanwisa Sabaichai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment 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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

500215

Thesis Title	MUTAGENIC MODIFICATION EFFECT OF SOME EDIBLE MUSHROOMS ON NITRITE TREATED BEEF CONCENTRATE USING AMES TEST
By	Miss Wanwisa Sabaichai
Field of study	Food Chemistry
Thesis Advisor	Linna Tongyonk, D.Sc.
Thesis Co-advisor	Kaew Kangsadalampai, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Oranong Kangsadalampai ..... Chairman

(Associate Professor Oranong Kangsadalampai, Ph.D.)

Linna Tongyonk ..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Linna Tongyonk, D.Sc.)

Kaew Kangsadalampai ..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Kaew Kangsadalampai, Ph.D.)

Surapong Keng ..... Member

(Assistant Professor Surapong Kengtong)

Suyanee Pongthananikorn ..... Member

(Assistant Professor Suyanee Pongthananikorn, Ph.D.)

วันวิสาข์ สบายใจ : ผลของเห็ดกินได้บางชนิดในการปรับเปลี่ยนฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำต้มเนื้อเข้มข้นที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทโดยการทดสอบเอมส์. (MUTAGENIC MODIFICATION EFFECT OF SOME EDIBLE MUSHROOMS ON NITRITE TREATED BEEF CONCENTRATE USING AMES TEST) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ลินนา ทองยงค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ, 96 หน้า.

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเข้มข้นจากเนื้อวัวต้มพร้อมกับเห็ดกินได้ปริมาณต่างๆ กัน 4 ชนิด คือ เห็ดกระดุม, เห็ดหอม, เห็ดนางรม และ เห็ดเป๋าฮื้อ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธีเอมส์ โดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสภาวะที่ไม่มีสารออกฤทธิ์กระตุ้นสารก่อกลายพันธุ์ แต่เมื่อนำสารสกัดเข้มข้นนี้ไปทำปฏิกิริยากับไนไตรท พบว่าแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์โดยตรงต่อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นการบ่งชี้ว่าในสารสกัดเข้มข้นเหล่านี้มีสารตั้งต้นของสารก่อกลายพันธุ์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไนไตรทแล้วเกิดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ขึ้น และการเติมเห็ดเหล่านี้นั้น ไม่สามารถลดการเกิดสารตั้งต้นของสารก่อกลายพันธุ์ได้ ซึ่งเมื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในสารสกัดเข้มข้นจากเนื้อวัวและสารสกัดเห็ดแต่ละชนิดก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน

ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าเมื่อผสมสารสกัดเห็ดเหล่านี้กับสารสกัดจากเนื้อวัวเข้าด้วยกันก่อนแล้วทำปฏิกิริยากับไนไตรทไม่สามารถลดฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเนื้อวัวเข้มข้นที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทได้ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของส่วนผสมของสารสกัดเห็ดและสารสกัดเข้มข้นจากเนื้อวัวที่ได้จากการทดลองจริงมีค่าต่ำกว่าผลรวมของฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดและสารสกัดเข้มข้นจากเนื้อวัวที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรทที่ได้จากการคำนวณ ยกเว้นสารสกัดเห็ดกระดุมและเห็ดนางรมที่ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของส่วนผสมที่ได้ระหว่างสารสกัดเห็ดและสารสกัดเข้มข้นจากเนื้อวัวมีค่าสูงกว่าผลรวมของฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดและสารสกัดเข้มข้นจากเนื้อวัวที่ทำปฏิกิริยากับไนไตรท เมื่อทดสอบโดยใช้ *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 เท่านั้น ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปถึงกลไกในการเสริมฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์นี้

ภาควิชา อาหารเคมี ลายมือชื่อนิสิต Wanvisa Sabaichai

สาขาวิชาอาหารเคมีและโภชนศาสตร์ทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

47766015 : MAJOR FOOD CHEMISTRY

KEY WORD: ANTIMUTAGENICITY / AMES / MUSHROOM / BUTTON / SHIITAKE/ OYSTER / ABALONE

WANWISA SABAICHAI : MUTAGENIC MODIFICATION EFFECT OF SOME EDIBLE MUSHROOMS ON NITRITE TREATED BEEF CONCENTRATE USING AMES TEST. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. LINNA TONGYONK, D.Sc., ASSOC. PROF. KAEW KANGSADALAMPAI, Ph.D. 96 pp.

It was found that the concentrates from beef boiled with various amounts of four edible mushrooms namely, button, shiitake, oyster and abalone mushrooms did not show the mutagenicity when tested with the Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 in the absence of metabolic activation. However, after nitrosation with nitrite they could exert the mutagenicity towards both strains. Thus, it was indicated that some mutagen precursors presented in all concentrates could interact with nitrite and addition of these edible mushrooms could not reduce the formation of these mutagen precursors. The same results obtained from studies of beef concentrate and these mushroom extracts.

The results also showed that the addition of each mushroom extract to the beef concentrate before treated with nitrite did not reduce the mutagenicity of nitrite treated beef concentrate. However, the actual mutagenicity of the mixtures of some mushroom extract and beef concentrate treated with nitrite was less than the calculated values obtained by summing the mutagenicity of nitrite treated mushroom extracts and nitrite treated beef concentrate. Exceptions were found in button and oyster mushroom extracts that the actual mutagenicity of these two mixtures were higher than the calculated mutagenicity on *S. typhimurium* strain TA98. The mechanism of this synergistic effect should be further investigated.

Department Food Chemistry Student's Wanwisa Sabaichai

Field of study Food Chemistry and Medical Nutrition Advisor's Linna Tongyonk

Academic year 2007 Co-advisor's

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deepest appreciation to Assistant Professor Dr. Linna Tongyonk, my thesis advisor , for her guidance, inavailable advice, supervision and encouragement throughout my graduate program. I am equally grateful to Associate Professor Dr. Kaew Kangsadalampai, my co-advisor for his kindness, comments and valuable suggestions.

Appereciation was extended to Associate Professor Dr. Oranong Kangsadalampai who had kindly served in the thesis committee for their constructive comments and kind suggestions.

I would like to thank all staff of Department of Food Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for co-operation and instruction in my Master degree knowledge.

I wish to acknowledge my gratitude to Ms. Oranuch Wongwattanasathien for her training, counseling and assistance with the first technical laboratory instructions. Many thanks are extended to all my friends for their helps, suggestions and encouragements throughout my work.

Finally, I wish to express my deep gratitude to my family for their loves, cares, supports and encouragements throughout my work.

CONTENT

Page

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENT..... vii

LIST OF TABLES..... x

LIST OF FIGURES..... xii

LIST OF ABBREVATIONS..... xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II LITERATURE REVIEW..... 4

2.1 The Role of Diet on Human Cancer..... 4

2.2 Anticarcinogenic Components in Plants..... 5

2.3 Mushrooms and Cancers..... 6

2.3.1 Button Mushroom..... 6

2.3.2 Shiitake..... 8

2.3.3 Pleurotus Mushroom..... 10

2.4 Mutagens from Cooked Food..... 12

2.4.1 Heterocyclic Amines (HAs)..... 14

2.4.2 Heterocyclic Amines in Boiled Foods..... 19

2.5 Anticarcinogenesis by Food Components..... 20

2.6 Dietary Nitrosating Compounds: Nitrate and Nitrite in Foods..... 23

2.7 The *Salmonella* Mutagenicity Test (Ames Test)..... 24

III MATERIALS AND METHODS..... 29

3.1 Chemical..... 29

CHAPTER **Page**

3.2 Experimental Design..... 30

3.3 Sample Preparations..... 31

3.3.1 Beef Concentrate..... 31

3.3.2 Mushroom Extracts..... 31

3.3.3 Concentrates from Beef Boiled with Selected Edible Mushrooms..... 31

3.4 Mutagenicity Testing..... 32

3.4.1 The Bacterial Tester Strains..... 32

3.4.2 Nutrient Agar..... 32

3.4.2.1 Preparation of a Minimal Agar Plate..... 32

3.4.2.2 Preparation of Top Agar..... 32

3.4.3 Mutagenicity of Beef Concentrate..... 33

3.4.4 Mutagenicity of Nitrite treated Beef Concentrate..... 35

3.4.5 Mutagenicity of Extracts from Selected Mushrooms Treated with and without Nitrite..... 37

3.4.6 Mutagenicity of Concentrates from Beef Boiled with Various Amounts of Each Selected Mushroom Treated with and without Nitrite..... 37

3.4.7 Mutagenicity Modification of Extracts from Various Edible Mushrooms on Mutagen Formation of Beef Concentrate..... 37

3.5 Data Manipulation..... 38

IV RESULTS..... 39

ix

4.1 Mutagenicity of Beef Concentrate..... 39

4.2 Mutagenicity of Extracts from Some Edible Mushrooms..... 41

4.3 Mutagenicity of Concentrates of Beef Boiled with

CHAPTER **Page**

Some Edible Mushrooms..... 44

4.4 Effect of Extracts from Selected Edible Mushrooms on the Mutagenicity of Beef Concentrate..... 58

V DISCUSSION..... 62

5.1 Mutagenicity of Beef Concentrate..... 62

5.2 Mutagenicity of Extracts from Edible Mushrooms..... 62

5.3 Mutagenicity of Concentrate from Beef Boiled with Various Edible Mushrooms..... 64

5.4 Effect of Extracts from Edible Mushrooms on the Mutagenicity of Beef Concentrate with and without Nitrite Treatment..... 66

VI CONCLUSION..... 68

REFERENCES..... 69

APPENDIX..... 90

BIOGRAPHY..... 96

LIST OF TABLES

Page

1. Mechanisms by which dietary antimutagens could protect against mutation..... 21
2. Genotype of the TA strains used for mutagenesis testing..... 27
3. Mutagenicity of beef concentrate after nitrite treatment towards *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation..... 39
4. Mutagenicity of beef concentrate after nitrite treatment towards *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation..... 40
5. Mutagenecity of extracts from some edible mushrooms after nitrite treatment towards *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation..... 42
6. Mutagenicity of extracts from some edible mushrooms after nitrite treatment towards *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation..... 43
7. Mutagenicity of concentrate from beef boiled with various amounts (g) of some edible mushrooms treated with nitrite towards *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation..... 45
8. Mutagenicity of concentrate from beef boiled with various amounts (g) of some edible mushrooms treated with nitrite towards *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation..... 49
9. Slopes from the graphs of the mutagenicity of concentrates from beef boiled with various amounts (g) of some edible mushrooms treated with nitrite towards *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 without metabolic activation..... 57
10. Effect of extracts from some edible mushrooms on mutagenicity of beef concentrate (80 µl) towards *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation..... 59

TABLE **Page**

11. Effect of extracts from some edible mushrooms on mutagenicity of beef concentrate (80 µl) towards *Salmonella typhimurium* strains TA100 without metabolic activation..... 54

12. Comparison of the calculated mutagenicity index obtained by summing the number of mutagenicity index of individual components and observed values of nitrite treated mixture of beef concentrate (80 µl) and mushroom extract towards *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation..... 61

13. Comparison of the calculated mutagenicity index obtained by summing the number of mutagenicity index of individual components and observed values of nitrite treated mixture of beef concentrate (80 µl) and mushroom extract towards *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation..... 62

LIST OF FIGURES

	Page
1. Button mushroom	6
2. Shiitake mushroom	8
3. Oyster mushroom	10
4. Abalone mushroom	10
5. Structures of Heterocyclic amines	15
6. Overall investigations to elucidate the effect of mushroom samples	30
7. Steps to determine the mutagenicity of food sample using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of S-9 mix	34
8. Steps to determine the mutagenicity of nitrite treated food sample using the Ames mutagenicity test (pre-incubation modification) in the absence of S-9 mix	36
9. Mutagenicity index of concentrates from beef boiled with button mushroom in different amounts (5, 10 or 20 g)	53
10. Mutagenicity index of concentrates from beef boiled with shiitake mushroom in different amounts (5, 10 or 20 g)	54
11. Mutagenicity index of concentrates from beef boiled with oyster mushroom in different amounts (5, 10 or 20g)	55
12. Mutagenicity index of concentrates from beef boiled with abalone mushroom in different amounts (5, 10 or 20 g)	56

LIST OF ABBREVATIONS

A&C	2-amino-9H-pyrido(2,3-b)indole
^{0}C	degree Celsius
DNA	deoxyribonucleic acid
et al.	et alii (and other)
g	gram
Glu-P-1	2-amino-6-methyldipyridol imidazole
Glu-P-2	2-amino dipyridol imidazole
HAs	heterocyclic amines
His^+	histidine prototrophy
hr	hour
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline
µg	microgram
µl	microlitre
MeA&C	2-amino-3-methyl-9H-pyrido(2,3-*b*)indole
MeIQ	2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline
MeIQx	2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-*f*] quinoxaline
mg	milligram
ml	milliliter
min	minute
mM	millimolar
N	normality
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenyimidazole [4, 5-*b*] pyridine
Trp-P-2	2-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4, 3-*b*] indole
W/V	weight/volume