
碩士學位論文

투스, 미역, 다시마 抽出物の 抗突然變異
및 抗菌效果

濟州大學校 大學院

食品工學科



1994年 12月

투스, 미역, 다시마 抽出物の 抗突然變異 및 抗菌效果

指導教授 金 洙 賢

朴 齊 石

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함

1994年 12月

朴齊石의 工學碩士學位 論文을 認准함



審査委員長	등	대진	
委 員	이	상	
委 員	권	수	

濟州大學校 大學院

1994年 12月

Desmutagenic and Antimicrobial Effects
of Extracts
from *Hizikia fusiforme*, *Undaria pinnatifida*,
Laminaria japonica

Che-Seok Park
(Supervised by professor Soo-Hyun Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIRMENTS FOR THE
DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND
TECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1994. 12.

목 차

Summary	1
I. 서론	2
II. 연구사	4
III. 재료 및 방법	9
1. 시료의 조제	9
2. 시료의 추출	9
3. 항돌연변이 검정	9
1) 표준 돌연변이원	9
2) 균주의 동정	9
(1) Histidine과 biotin 요구성	10
(2) Deep rough 돌연변이	10
(3) <i>uvrB</i> 돌연변이	11
(4) R-factor 돌연변이	11
3) S-9 조제	11
(1) 쥐 간 효소의 유도	11
(2) S-9 mix의 조제	13
4) 표준 돌연변이원의 dose-response	14
5) 항돌연변이 검정	15
4. 항균성 검정	15
1) 균주	15

2) 배지	15
3) 항균성 검정	16
IV. 결과 및 고찰	17
1. 표준 돌연변이원의 dose-response	17
2. 용매별 추출물의 항돌연변이 효과	20
1) MMS에 대한 항돌연변이 효과	20
2) ICR191 및 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과	23
3. 에탄올 농도별의 항돌연변이 효과	24
1) 톳 추출물의 항돌연변이 효과	24
2) 미역 추출물의 항돌연변이 효과	26
3) 다시마 추출물의 항돌연변이 효과	29
4) NDMA에 대한 항돌연변이 효과	29
4. 에탄올 농도별 추출물의 항균효과	32
1) 톳 에탄올 농도별 추출물의 항균효과	32
2) 미역 및 다시마 추출물의 항균효과	32
V. 요약	34
참고문헌	35

Summary

Desmutagenic and antimicrobial effects of the extracts by different solvents and different ethanol concentrations from *Hizikia fusiforme*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida* were investigated.

Desmutagenic effects of the solvent extracts from *Hizikia fusiforme* were the highest against methyl methanesulfonate(MMS) in hexane extract and against 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine (ICR191) in ethanol extract, but no against sodium azide in all solvent extracts tested. Desmutagenic effects of the solvent extracts from *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica* were the highest against ICR191 in ethanol extract, but no against sodium azide and MMS in all solvent extracts tested.

Desmutagenic effects against MMS and ICR191 of 90% ethanol extracts from *Hizikia fusiforme* were up to 70 and 95%, respectively. There was no desmutagenic effect against sodium azide. Desmutagenic effects against ICR191 of 30~90% ethanol extracts from *Laminaria japonica* were up to 70%, but there were no desmutagenic effects against sodium azide and MMS. Especially, all ethanol extracts showed high desmutagenic effects against ICR191. Desmutagenic effects of ethanol extracts from *Laminaria japonica* against *N*-nitrosodimethylamine(NDMA) were higher than from *Undaria pinnatifida*. Especially, 70 and 90% ethanol extracts from *Laminaria japonica* showed 97% of desmutagenic effects in TA100.

Antimicrobial effect of 70 and 90% ethanol extracts from *Hizikia fusiforme* had potent antimicrobial activities against *Escheichia coli*, and *Bacillus subtilis*. Ethanol extracts from *Laminaria japonica* showed more effective antimicrobial effects than those from *Undaria pinnatifida*. Only 50% ethanol extract from *Undaria pinnatifida* showed growth inhibition effect against *Saccharomyces cerevisiae*. Seventy percent ethanol extract from *Laminaria japonica* showed growth inhibition effect against all strains tested, while 90% ethanol extract showed against *E. coli*. and *B. subtilis*

I. 서론

최근 각종 암에 의한 사망률이 점차 증가하고 있는데, 이에 대한 원인은 환경오염, 식품첨가물, 화학물질, 방사선 및 바이러스 등은 물론, 특히 인간이 섭취하는 음식물에서 유래하는 암의 문제가 발생하고 있는 실정이다(Sugimura, 1982).

식품 중에 존재하는 유독물질로는 nitrosamine, aflatoxin B₁(AFB₁), 다환성 방향족 탄화수소, 아미노산 열분해산물 및 Maillard 반응 생성물 등이 알려져 있다(Bailey 등, 1993). 이들 유독물질 중에서 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA)를 비롯한 dialkylnitrosamine은 강력한 발암물질로서 혼합기능 산화 효소계(mixed function oxidase system: MFO system)에 의존하는 cytochrome P-450의 α -hydroxylase의 작용에 의해 α -탄소 원자의 hydroxyl화가 촉매되고 대사적으로 활성화된 후 독성, 암유발성 중간 생성물인 alkonium 이온으로 전환되어 암을 일으키게 된다(Guttenplan, 1984).

한편 역학연구로부터 온 자료들을 보면, 과실류와 녹황색 채소를 상식하는 경우 일부 종양에 대한 위험 감소에 많은 역할을 하고 있으며, 또한 이들 식품에서 유래되는 인자들은 여러 실험자료들에 의해서 발암물질 생성을 저해하는 것으로 알려지고 있다(Wattenberg, 1990).

식품 중에 존재하는 암 예방과 관련된 물질로는 oleic acid, linolic acid, vitamin C, E, β -carotene, selenium, glutathione, uric acid, 야채의 phenol 성분 등이 알려져 있다(Lai 등, 1980). 식품 중에 함유되어 있는 항돌연변이원 물질에 대한 연구로는 식용 야채의 생즙(Kada, 1978; Lai, 1980), 녹차잎(Kada 등, 1985; Oguni 등, 1988), 적색 자두(함 등, 1987), 사과(백 등, 1990a, b), 들깨잎(이 등, 1993), 해조류의 지질과 다당류(Noda 등, 1989), 냉동 건조 야채 및 시금치(Shinohara 등, 1991a, b), 야채류 및 버섯(Ueda 등, 1991) 등이 있다.

해조류는 오래전부터 우리나라를 비롯한 극동지역에서 식용되고 있고, 비타민, 무기질(이 등, 1980; 吉材과 大石, 1973; 이, 1983) 등이 균형있게 분포되어 있어서

대사작용을 개선함을 물론, 저칼로리 다당류는 식이성섬유로서 정장작용과 유독물질 제거효과(한과 고, 1986)가 있고, 특정의 점질성 다당류 및 저분자 생리활성물질은 혈압과 콜레스테롤치의 정상화(Ayako 등, 1992; 한, 1986; 최 등, 1986), 암 예방(Ryu 등, 1989; Ohkawa 등, 1992, 1993) 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 해조 중의 다당류(日本水産學會編, 1983; Noda 등, 1989) 및 생약제(日本公正書協會, 1986) 등에도 항균, 항암물질이 분포하며 식품의 이용에 관한 연구가 이루어지고 있다.

따라서 본 연구는 Ames 시험계를 이용하여 해조식품으로 널리 이용되고 있고, 국내 생산량이 많은 미역, 다시마, 톳을 용매별 및 에탄올 농도별로 추출하여 표준 돌연변이원인 MMS, ICR191, sodium azide 및 강력한 발암물질로 알려진 NDMA에 대한 항돌연변이 효과 및 에탄올 농도별 추출물의 항균효과를 검색하였다.



II. 연구사

식품의 가공, 저장, 조리 중에 식품 성분간의 상호반응으로 생성되는 단백질 열 분해산물, *N*-nitrosamine, 저분자 카르보닐 화합물들은 돌연변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(Hodge 등, 1972; Nagao와 Sugimura, 1983).

MMS는 대사활성화 없이 DNA에 직접 작용하는 알킬화제로서 guanine의 O⁶ 위치에 작용하여 발암성을 나타내는 물질로서(Koch 등, 1994), 염기치환성 돌연변이원 검정에 유용한 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100과 TA102에 대한 양성 돌연변이원 물질로서 활용되고 있다(Maron과 Ames, 1983; Callais 등, 1991; Einisto 등, 1991; Fracasso 등, 1992).

ICR191은 반응기가 DNA의 guanine의 7-N 위치에 결합해서 독성을 나타내는 acridine 유도체로서(Levin 등, 1982b) 구조이동성 돌연변이원 검정 균주인 *S. typhimurium* TA97에 대한 양성변이원 물질로 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983).

Sodium azide는 포유동물계를 이용한 돌연변이 검정법에서는 활성을 나타내지 못하지만, 식물이나 세균을 이용한 검정법에서만 활성을 나타내는 염기치환성 돌연변이 유발물질로서(Koch 등, 1994), *higG46* 대립형질을 수반하는 *Salmonella typhimurium* TA100에 대한 양성변이원 물질로 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983; Crebell 등, 1991; Nielson 등, 1992; Krivobok 등, 1992; Prival 등, 1991; Forster 등, 1992).

N-Nitrosamine은 강력한 발암물질로서 1956년에 Magee와 Barnes에 의해서 *N*-nitrosodimethylamine의 발암성을 보고한 이래 많은 종류의 *N*-nitrosamine의 발암성이 입증되고 있다. *N*-Nitrosamine은 산성 pH에서 용이하게 생성되고(Mirvish, 1970), 그 생성 pH가 인체의 위액 pH 조건과 유사하므로 인체의 위내에서 *N*-nitrosamine 생성 가능성이 매우 높고 또한 중성부근의 pH를 갖는 대부분의 식품에서는 가열에 의해서도(Scanlan, 1975), 그리고 formaldehyde나 장내세균

과 같은 적당한 촉매제가 있을 경우 중성이나 알카리성 영역에서도 생성된다 (Oshima와 Kawabata, 1977; Yang 등, 1977).

NDMA를 비롯한 dialkyl nitrosamine은 강력한 발암물질로서 *N*-nitrosoamide와는 달리 혼합기능 산화 효소계에 의존하는 cytochrome P-450의 α -hydroxylase의 작용에 의해 α -탄소 원자의 hydroxyl화가 촉매되어 대사적으로 활성화되어 독성, 암유발성 중간 생성물인 alkonium 이온으로 전환되어 암을 일으키게 되는데, *N*-nitrosamine의 α -hydroxyl화된 대사물질은 비효소적으로 분해된 후, 최종 돌연변이원인 methonium이온으로 되고(Guttenplan, 1984), guanine의 7-N 위치를 methyl화시키거나 O⁶-methylguanine을 생성시켜 다른 DNA 염기를 치환시킴으로써 암을 일으키게 된다(Pegg, 1983; Tricker와 Preussmann, 1991).

N-Nitrosamine의 생성억제에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있는데, Mirvish 등(1972)은 ascorbic acid가 산성 수용액 상태에서 매우 효과적으로 니트로화를 저해한다고 하였고, Tannenbaum과 Mergens(1980)은 α -tocopherol이 지질 상에서 ascorbic acid와 비교하여 매우 효과적으로 니트로화를 저해한다 하였으며, Gary와 Dugan(1975)은 tocopherol, ascorbate 및 polyphenol 화합물의 사용으로 *N*-nitrosamine의 생성이 효과적으로 억제되었다고 하였다. Kato 등(1987)은 Maillard 반응 생성물인 melanoidin이 아질산염 분해능 및 *N*-nitrosamine 생성억제능이 있다고 보고하였다.

*S. typhimurium*을 이용한 돌연변이 유발성 검정은 초기에는 *S. typhimurium* LT-2 histidine auxotroph 균주의 역돌연변이 빈도를 비교 측정하여 돌연변이 유발성을 검정하였으나, 변이원에 대한 감수성을 높이기 위하여 보수결여 돌연변이 (repair deficient mutation) 및 세포벽 돌연변이(cell wall mutation)를 도입하였고 (Ames 등, 1973), 또한 감수성을 높이기 위해서 R-factor plasmid인 ampicilline 저항인자 pKM101(McCann 등, 1975a, b)을 도입시킨 TA98과 TA100 균주 및 R-factor plasmid인 tetracycline 저항인자 pAQ1(Levin 등, 1982a)을 도입시킨 TA102 균주가 분리되어 표준 돌연변이 검정에 이용되고있다.

또한, *in vitro*에서 간접적으로 포유동물의 생체 대사작용과 유사 조건으로 한

비 활성물질들이 생체내에 흡수되어 활성화된 후 돌연변이를 일으킬 가능성 여부를 추적하기 위해, 포유동물의 간 microsome 효소복합체(liver microsome enzyme complex)인 S-9을 도입 사용하고 있다(Ames 등, 1975; Garner 등, 1972).

한편 *Salmonella* 검정균주에서 histidine을 요구하는 모든 돌연변이체는 복귀 돌연변이 부위에 G-C 염기쌍을 갖는다. 즉, -C-C-C- 염기치환성 균주인 TA100 (Barnes 등, 1982), -C-C-C-C-C-C- 구조이동성 균주인 TA97(Levin 등, 1982b), -C-G-C-G-C-G-C-G- 구조이동성 균주인 TA98(Isono 등, 1974) 그리고 복귀 돌연변이 부위에 A-T 염기쌍을 갖는 TA102(Levin 등, 1982a)이다. 이들 *S. typhimurium*을 이용한 Ames 시험계를 이용하여 검정된 화학물질의 암유발성은 돌연변이 유발성으로 나타나는데, 발암물질의 85% 이상의 돌연변이 유발성을 나타내고 있다(McCann 등, 1975a; Ames, 1979).

돌연변이 유발을 억제하기 위한 방법으로 항돌연변이 효과에 관한 연구가 널리 행하여지고 있는데, Kada 등(1978)은 야채 성분 중에는 tryptophan 열분해 산물과 같은 돌연변이 물질의 활성을 억제하는 효과가 있다고 하였으며, Lai 등(1980)은 야채를 물과 아세톤으로 추출하여 돌연변이 효과를 시험한 결과 3-methyl-chlolanthiene과 benzo(a)pyrene의 활성이 저해되어 야채의 생즙이 항돌연변이 효과가 있음을 보고하였다. Sato 등(1986)은 humic acid가 benzo(a)pyrene과 3-aminoanthracene의 돌연변이 유발을 억제한다 하였다.

村上(1983)은 식품성분으로서 식물조직 중에 단독 혹은 배당체로 함유되어 있는 polyphenol 화합물이 종양 억제작용이 있음을 밝혔고, Kada 등(1985)은 차잎의 polyphenol 성분 중 catechin류가 항돌연변이 작용 또는 종양의 발생을 억제시킨다고 하였다.

Ong 등(1986)은 불에 구운 음식이나 담배 등과 같이 일상 생활에서 섭취되는 돌연변이 물질들을 *S. typhimurium* TA98을 이용하여 클로로펠린에 의한 항돌연변이 효과를 실험한 결과 90% 이상의 돌연변이 저해효과가 있다고 하였다. Ueda 등(1991)은 107종의 야채와 60종의 버섯을 물로 추출하여 *S. typhimurium* TA98을 이용하여 Trp-P-1에 대한 항돌연변이 효과를 실험한 결과 야채 추출물이 버

첫 추출물보다 항돌연변이 효과가 강하였다고 보고하였다.

일상 식품 중에 항암성을 갖는 생리활성물질에 관한 연구로는 산초와 약초로부터 추출된 다당류의 항암활성(Moon 등, 1983; Lee 등, 1989), 단백다당류에서의 항암활성(Ahn, 1989), 함 등(1987, 1994), 백과 함(1990)의 적색자두와 사과와 효소갈변생성물의 돌연변이 억제작용, 이 등(1993)의 들깨잎 추출물의 항돌연변이 효과에 대한 보고들이 있고, 김 등(1993)의 쌀의 부위별 항돌연변이 효과, 다당류 및 지질에서의 항암활성(Noda, 1989), Helser와 Hotchkiss(1994)의 토마토 추출물 중 vitamin C와 phenol 획분의 *N*-nitroso 화합물 생성 저해에 관한 보고가 있다. 그리고 또한 백과 박(1993)의 김치 추출물에 대한 항돌연변이 효과, 이 등(1993)의 십자화과 채소와 케일즙이 항돌연변이 효과, 김 등(1993)의 갓에서 분리된 4-decanol의 항돌연변이 효과에 대한 보고들이 있다.

해조류에 다량으로 함유되어 있는 화학적으로 특징적인 점질성 다당류들은 어떤 생리활성작용이 있는 것으로 알려지고 있다(Noda 등, 1989; Rositto 등, 1985). 해조류 성분의 항암성에 관한 연구로는 西澤 등(1984)의 다시마 등 수종의 갈조류를 항암제 개발의 원료로 이용할 수 있다는 보고, 모자반에서 얻은 다당류 분획이 수명연장 효과(Ito 와 Sugimura, 1976), 녹조류, 갈조류, 홍조류 등에서의 항암 효과(Noda 등, 1989), Ryu 등(1986)의 해조류 추출물의 항돌연변이 효과, Kim 등(1986)의 해조류 Maillard 반응 생성물의 돌연변이 활성 억제에 대한 보고들이 있다.

Ohkawa 등(1992)에 의하면, 천연 다시마와 양식 다시마(1년, 2년)를 물로 추출하여 수용성 분획과 불용성 분획으로 구분하고, *S. typhimurium* TA98 균주에 양성변이원 물질인 dinitropyrene(DNP)에 대한 항돌연변이 효과를 실험한 결과 다시마 불용성 분획을 5mg/ml 첨가하였을 때 DNP의 돌연변이 활성이 30%가 감소하였고, 다시마 불용성 분획의 양을 20mg/ml 첨가하였을 때 DNP의 돌연변이 유발성이 85% 억제되었다고 보고하고 있는데, 이는 소화되지 않는식이섬유로 구성된 다시마의 불용성 분획이 분해되지 않는 안정한 상태로 흡착되어 식품 중에 존재

하는 돌연변이원의 흡착을 방해하기 때문일 것이라고 보고하였다.

Ohkawa 등(1993)은 건조미역, 건조다시마 및 건조톳을 포함하는 25종의 해조류를 수용성 분획과 불용성 분획으로 추출한 후, 불용성 분획을 발암물질로 알려진 DNP, benzo(a)pyrene, Trp-P-1, Trp-P-2, 2-aminoanthracene에 대하여 실험한 결과 톳은 돌연변이 활성을 강하게 저해하였으며, 미역 및 다시마는 위의 양성 변이원 물질에 대하여 중간 정도의 항돌연변이 효과가 있다고 보고하였다.

한편, 천연물에 존재하는 항균성물질을 식품의 보존에 이용하고자 하는 연구는 오래전부터 수행되었고 현재도 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Beuchat 와 Golden, 1989). 이러한 천연 항균성 물질로서는 단백질(Ashton과 Busta, 1968), 유기산(Cox 등, 1974; Yamamoto 등, 1984), 탄소수가 12~18개의 지방산(Neiman, 1985), 향신료(Sahika와 Mehmet, 1986) 등이 알려져 있다.

해조류 중의 다당류(森廣枝, 1983; Noda 등, 1989), 생약제(日本公正書協會, 1986) 등에도 항균, 항암물질이 분포되어 있어서, 항균, 항암물질의 검색과 식품의 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이와 신(1991a, b)의 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성물질의 검색 및 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균 특성에 관한 연구, 박 등(1992a, b)의 약제 추출물과 자초 추출물의 항균특성에 관한 보고들이 있다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 시료의 조제

미역과 다시마는 제주시내 동문시장에서, 툫은 북제주군 함덕 어촌계에서 구입하여 건조기(40℃)에서 2시간 동안 건조시킨 후 건식분쇄기(건홍전기, KH-201)로 분쇄하고 50 mesh 이상의 것을 취합하여 추출용 시료로 하였다.

2. 시료의 추출

시료의 용매별 추출은 툫의 경우 증류수, 에탄올(99.9%, Hayman Ltd., USA), 에틸에테르(99.0%, BDH Ltd., USA), 및 헥산(86%, Fisher Scientific, USA)을 사용하여, 그리고 미역과 다시마의 경우 증류수, 에탄올, 메탄올(99.9%, Hayman Ltd., USA) 및 헥산을 사용하여 추출하였으며, 에탄올 농도별 추출은 0, 30, 50, 70, 90% 에탄올을 사용하였다. 즉, 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 환저플라스크에 시료 20g과 용매를 각각 500ml씩 넣고 40℃(에틸에테르는 34℃)에서 3시간 동안 추출하여 얻은 액을 두겹의 가제로 여과한 후, 여지(Toyo No. 5A)로 재차 여과하였다. 이 여액을 40℃에서 회전진공 증발농축기로 완전 건조시킨 후, 증류수를 사용하여 100ml로 하였고, 이 액을 다시 Whatman GF/C 여지로 여과한 후 검색용 시료로 사용하였다.

3. 항돌연변이 검정

1) 표준 돌연변이원

MMS(Aldrich, U.S.A.), ICR191(Sigma, U.S.A.), Sodium azide(Sigma, U.S.A.) 및 NDMA(Wako, Japan)를 표준 돌연변이원으로 사용하였다.

2) 균주의 동정

시험균주는 *S. typhimurium* TA97, TA100 및 TA102를 사용하였으며, TA97은

구조이동성 변이원 검정에 민감한 균주이고 TA100과 TA102는 염기치환성 변이원 검정에 민감한 균주로써 정기적으로 histidine 요구성, deep rough, UV 감수성, R-factor 등의 유전형질을 확인한 후 시험균주로 사용하였다. 이들 균주의 유전형질은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Genotypes of the TA strains used for mutagens testing.

Strain	Histidine mutation	LPS	Repair	R-factor
TA 97	<i>hisD6610</i>	<i>r_h</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R
TA 100	<i>hisG46</i>	<i>r_h</i>	Δ <i>uvrB</i>	+R
TA 102	<i>hisG428(pAQ1)</i>	<i>r_h</i>	+	+R

All strains were originally derived from *Salmonella typhimurium* LT-2.

Wild-type genes are indicated by a +. The deletion(Δ) through *uvrB* also includes the nitrate reductase and biotin(*bio*) genes. The *r_h* mutation eliminates the polysaccharide side chain of the LPS that coats the bacterial surface.

R = *pKM101*; LPS : lipopolysaccharide.

From Ames *et al.*(1983).

(1) Histidine과 biotin 요구성

시험 균주의 *his⁺* 형질은 선택 배지상에서 histidine 요구성을 입증함으로써 확인되었다. 시험균주는 *bio* 유전자를 통하여 확장된 *uvrB* 결실 균주이기 때문에 TA102를 제외한 모든 표준 검정 균주에 의해 요구된다. 0.1M L-histidine 및 0.5mM biotin을 각각 0.1ml 첨가한 배지와 첨가하지 않은 최소배지에 각각의 균주를 도말하여 배양했을 때 histidine이 첨가된 배지에서는 생육하나 histidine이 첨가되지 않은 배지에서는 생육하지 않는 균을 선택하였다.

(2) Deep rough(*r_h*) 돌연변이

Deep rough 형질을 지닌 균주들의 crystal violet에 대한 감수성을 시험하였다. 하룻밤 배양된 신선한 균주 0.1ml와 45℃로 유지된 top agar 2ml를 시험관에 넣고

저속으로 3초간 혼합한 후 Nutrient agar plate에 부어 plate상에 잘 퍼지도록 하여 수분이 지난 후 top agar가 굳으면 crystal violet 10 μ l를 직경 6mm의 멸균여지에 흡수시킨뒤 균이 접종된 nutrient agar상에 떨어뜨리고 37 $^{\circ}$ C로 12시간 배양한다. Deep rough 형은 crystal violet의 독성 작용으로 균주가 사멸하기 때문에 disc 주위에 저해 지역이 생성되나 야생형(wild-type) 균주는 저해 지역이 나타나지 않는다. Deep rough 균주는 대략 14mm 정도의 저해 지역이 나타나는 균주를 선택하였다.

(3) *uvrB* 돌연변이

uvrB 돌연변이는 이들 균주들이 UV에 대해 민감함을 입증함으로써 확인되었다. Nutrient agar plate 상에 균주를 도말하여 33cm의 거리에서 15W 자외선 살균등을 8초간 조사하고 37 $^{\circ}$ C에서 12~14시간 배양한다. *uvrB* 돌연변이 균주는 plate의 UV 비조사 부분에서만 성장하기 때문에 비조사 부위에서 성장하는 균주를 선택하였다. TA102는 UV에 대한 감수성이 없는 균주이기 때문에 UV를 조사하여도 plate 상에서 성장하는 균주를 선택하였다.

(4) R-factor 돌연변이

R-factor 균주는 plasmid가 약간 불안정하여 종종 그 형질을 잃어버리는 수가 있기 때문에 ampicillin 내성 인자의 존재에 대하여 정기적으로 검사하였다.

Ampicillin 내성을 검사하기 위해서는 plate(TA102는 ampicillin과 tetracycline) 상에 histidine 요구성 확인에 설명된 방법을 사용하여 ampicillin을 함유하는 plate(TA102는 ampicillin과 tetracycline) 상에 균주를 도말하고 12~24시간 동안 배양한 후 plate 상에서 성장하는 균주를 선택하였다.

3) S-9 조제

(1) 쥐 간 효소의 유도

쥐 간 효소의 유도는 Maron과 Ames(1983)의 방법에 따라 대략 200g의 雌性 Sprague-Dawley rat를 사용하여 Fig. 1과 같이 행하였으며 모든 조작은 무균적으로 실시하였다.

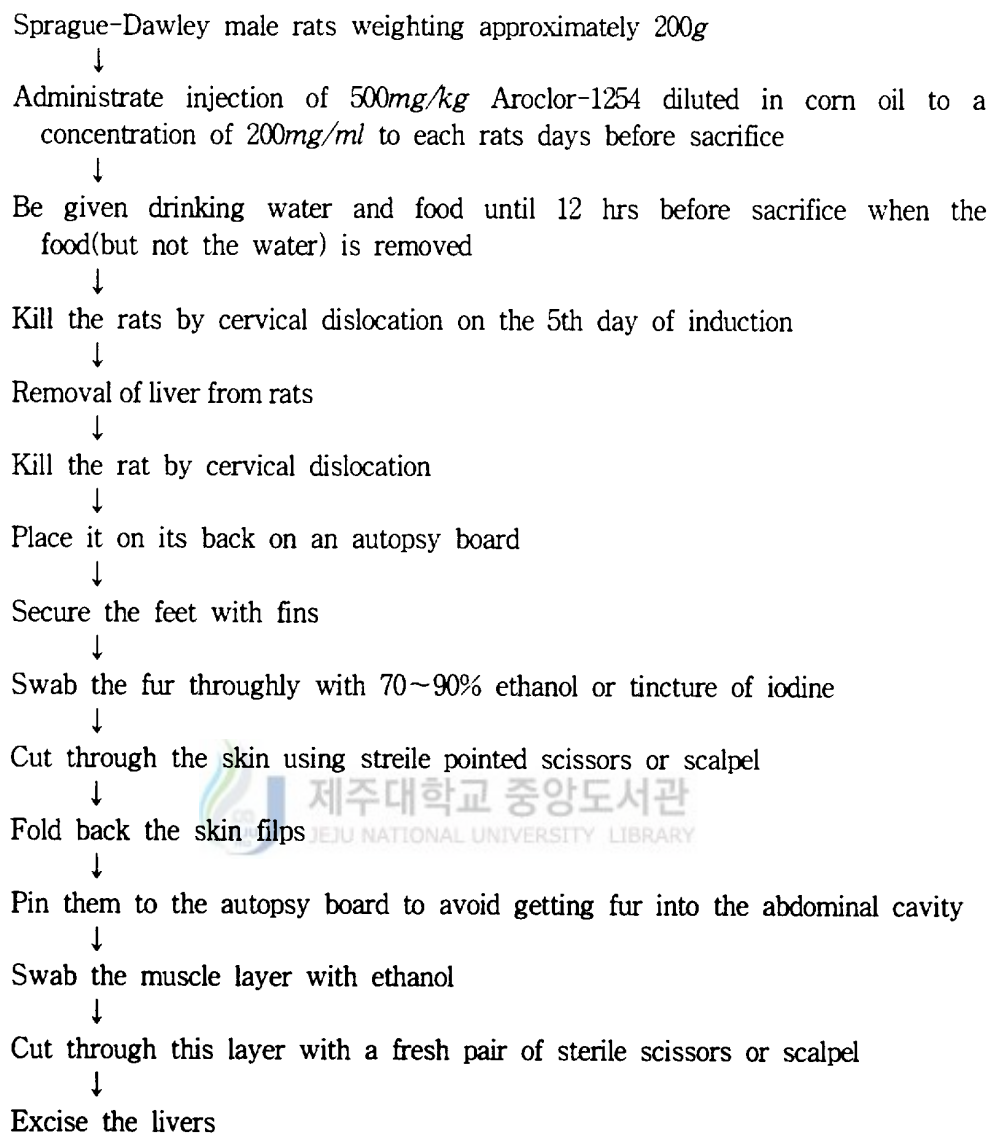


Fig. 1. Induction of rat liver enzyme.

(2) S-9 mix의 조제

S-9 mix는 간 효소로부터 Fig. 2와 같이 S-9 fraction을 조제하였으며, S-9 mix의 조성은 Table 2와 같다.

Place the freshly excised livers in preweighted beakers containing approximately 1ml of chilled 0.15M KCl per g of wet liver



After weighting, wash the liver several times in fresh, chilled KCl



Wash successively in KCl to insure a sterile preparation and to remove hemoglobin which can inhibit the activity of the cytochrome P-450 enzyme



Transfer the washed livers to a beaker containing 3ml/g of 0.15M KCl and mince with sterile scissors, and homogenize with a Polytron homogenizer



Centrifuge the homogenate for 10 min at 9,000g ($g = 1.12 \times r \times n^2 \times 10^{-5}$)



Decant the supernatant(the S-9 fraction) and save



Determine sterility of the preparation by plating 0.1ml on minimal agar containing histidine and biotine



Distribute the freshly prepared S-9 fraction in 1~2ml portions in small Nunc tubes, Freeze quickly in bed of crushed dry ice, and store at -80°C



Thaw the frozen S-9 at room temperature and place in a container



Make S-9 mix as soon as thawing the S-9



Determine sterility of the S-9 mix by plating 0.5ml on minimal glucose agar

Fig. 2. Preparation of S-9 mix from rat liver homogenate.

Table 2. Composition of S-9 mix(rat microsomal enzymes + cofactors)

Ingredient	per 10ml
Mgcl2-KCl salts	0.2ml
0.2M phosphate buffer , pH7.4	5ml
0.1M NADP	0.4ml
1M glucose-6-phosphate	0.05ml
Rat liver S-9	1ml
Sterile distilled water	3.35ml

4) 표준 돌연변이원의 dose-response

표준 돌연변이원의 dose-response는 Maron과 Ames(1983)의 표준평판배지법에 따라 *S. typhimurium* TA97, TA100 및 TA102를 사용하여, 그리고 대사활성을 요구하는 NDMA의 dose-response는 Yahagi 등(1977)의 예비배양법에 따라 *S. typhimurium* TA100과 TA102를 이용하여 Fig. 3과 같이 검정하였다.

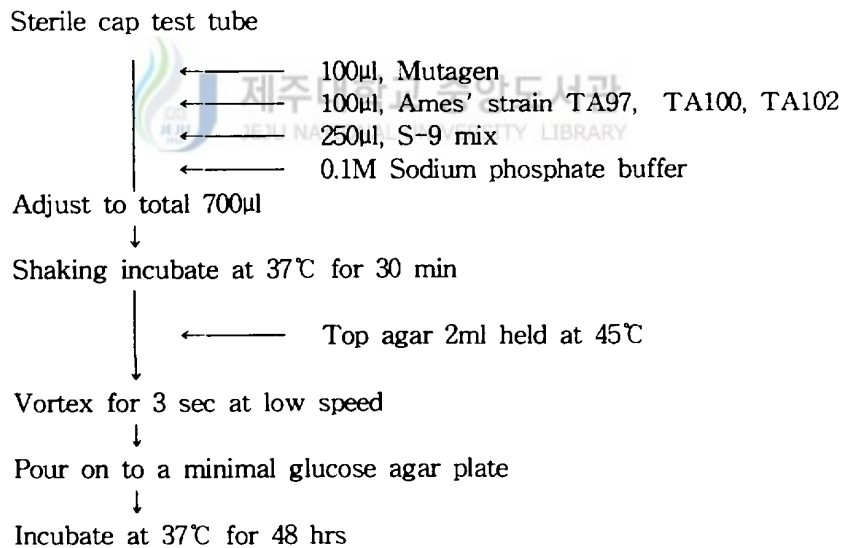


Fig. 3. Procedure for mutagenic test.

5) 항돌연변이 검정

MMS, ICR191, sodium azide 및 NDMA에 의해 유도된 돌연변이에 대한 뜻, 미역 및 다시마의 용매별 및 에탄올 농도별 추출물의 억제효과를 검토하기 위하여 *S. typhumurium* TA97, TA100, TA102 균주를 이용하여 발암물질에 대한 이들 추출물의 항돌연변이 효과를 검정하였다. 즉, 각각의 멸균된 마개 달린 시험관에 표준 돌연변이원 100 μ l, 추출물 100 μ l, 하루밤 배양된 균주($1\sim 2 \times 10^9$) 100 μ l를 넣고, 0.2M phosphate buffer를 넣어 700 μ l가 되도록 조정된 다음(대사활성을 요구하는 NDMA는 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 예비배양한다), 여기에 45 $^{\circ}$ C로 유지된 top agar 2ml를 넣어 3초간 vortex하고 minimal glucose agar plate에 부어 골고루 퍼지게 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 revertant colony를 계수하였다.

4. 항균성 검정

1) 균주

추출물에 의한 생육저해 여부를 확인하기 위하여 다른 균주에 비해 생리적, 유전적 특성이 비교적 상세히 알려져 있는 미생물을 공시균주로 사용하였다. 즉 원핵생물로서 그람음성균인 *Escherichia coli* ATCC 8739, 그람양성균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, 진핵생물로서 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763을 공시균주로 사용하였다.

2) 배지

미생물 배양용 배지로는 대장균의 경우 Luria Bertani 배지, 고초균의 경우 Nutrient broth, 효모의 경우 Yeast-malt 배지를 각각 사용하였다. 피검색시료는 사용 전에 멸균된 0.45 μ m의 membrane filter로 여과하였으며, 시료의 pH가 균체의 생육에 미치는 영향을 최소화하기 위해서 사전에 해당 균주에 맞게 pH를 조절하였다(*E. coli*, pH 7.5; *B. subtilis*, pH 6.8; *S. cerevisiae*, pH 5.4).

3) 항균성 검정

톳 추출물의 항균성 검정은 filter disc법, 미역과 다시마 추출물의 항균성 검정은 탁도법으로 측정하였다.

Filter disc법은 stock culture로부터 각 균주 1 백금이를 취해 5ml의 액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 진탕배양에서 배양한 배양액 0.1ml를 24시간 건조시킨 고체배지 상에 유리막대로 균일하게 도말시킨 후 멸균된 원판형 여지(6mm filter paper disc, Whatman No. 2)를 plate 표면위에 올려놓고 각 추출물을 20 μ l씩 흡수시켜 24시간 동안 배양(*E. coli* 와 *B. subtilis*, 37℃; *S. cerevisiae*, 28℃)한 후 disc 주위의 저해지역의 직경(mm)을 측정하여 항균성 유무와 항균력의 척도로 활용하였다.

탁도법은 stock culture를 1백금이를 5ml의 액체배지에 접종하여 1~2일간 배양하였다. 신선한 배지 5ml를 함유한 tube에 추출물 및 상기 배양액 0.1ml를 각각 넣고 37℃(*S. cerevisiae*는 28℃)에서 24시간 배양한 후 추출물만을 넣고 배양한 배양액을 대조액으로 하여 620nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 항균효과를 확인하였다.



IV. 결과 및 고찰

1. 표준 돌연변이원의 dose-response

MMS와 sodium azide는 염기치환성 돌연변이원으로 TA100과 TA102를 이용한 돌연변이 검정시 양성반응물질로 이용되고 있고, ICR191은 구조이동성 돌연변이원으로 TA97을 이용한 돌연변이 검정시에 양성반응물질로 이용되고 있는데(Maron과 Ames, 1983), 이들 물질을 양성반응물질로 하여 dose-response를 시험한 결과는 Fig. 4, 5, 6 및 7에 나타내었다. MMS는 TA100과 TA102에서 0.9mM/plate를 투여하였을 때 각각 plate당 revertant colony 수가 1,176 및 3,450으로 가장 높은 돌연변이 활성을 나타내었고, 이 보다도 높은 농도에서는 감소하였으며, dose-response 곡선도 직선을 나타내지 않았다(Fig. 4). 그러나 TA97에 대한 돌연변이 활성은 없는 것으로 나타났다. ICR191은 plate당 3.0 μ g을 투여하였을 때 TA97에서 revertant colony 수가 5,039였으며, plate당 2.0 μ g 이하의 농도로 투여하였을 때는 직선적인 dose-response 곡선을 나타내었다(Fig. 5). 그러나 TA100과 TA102에서는 돌연변이 활성을 보이지 않았다. Sodium azide는 plate당 5.0 μ g을 투여하였을 때 TA100에서 1,033으로 가장 높은 돌연변이 활성을 나타내었고 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였으며, plate당 5.0 μ g 이하의 농도에서는 ICR191과 마찬가지로 직선적인 dose-response 곡선을 나타내었다(Fig. 6). 그러나 TA97과 TA102에서는 돌연변이 활성을 보이지 않았다. NDMA는 plate당 14 μ M을 투여하였을 때 TA100과 TA102에서 revertant colony 수가 각각 3,735 및 4,317로 가장 높은 돌연변이 활성을 나타내었으며, 14 μ M 이하의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 돌연변이 활성이 직선적으로 증가하였으나 14 μ M 이상의 농도에서는 돌연변이 활성이 감소하였다(Fig. 7). 따라서 해조류 추출물에 의한 돌연변이 억제효과는 각 표준 돌연변이원물질의 dose-response 곡선상에서 직선적으로 증가하는데, 어느 한 농도를 선택하여 표준 돌연변이원물질로 사용하였다. 즉, MMS는 plate당 0.9mM, ICR191은 0.5 μ g, sodium azide는 5.0 μ g, 그리고 NDMA는 7 μ M을 항돌연변이 효과 검정시 양성반응물질로 선택하였다.

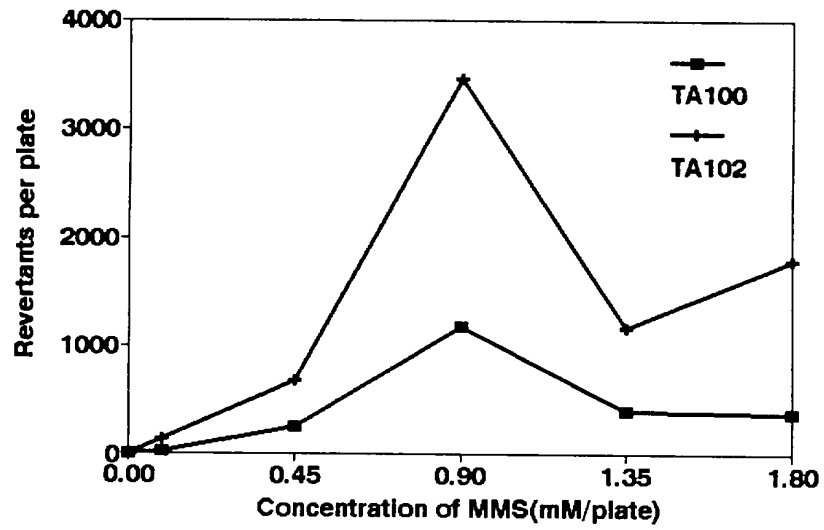


Fig. 4. Dose-response of MMS for TA100 and TA102 (Spontaneous revertants are subtracted).

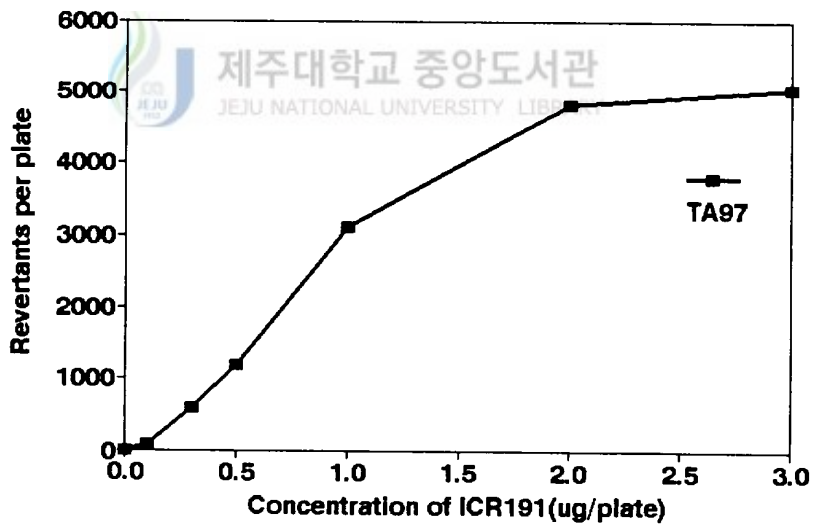


Fig. 5. Dose-response of ICR191 for TA97 (Spontaneous revertants are subtracted).

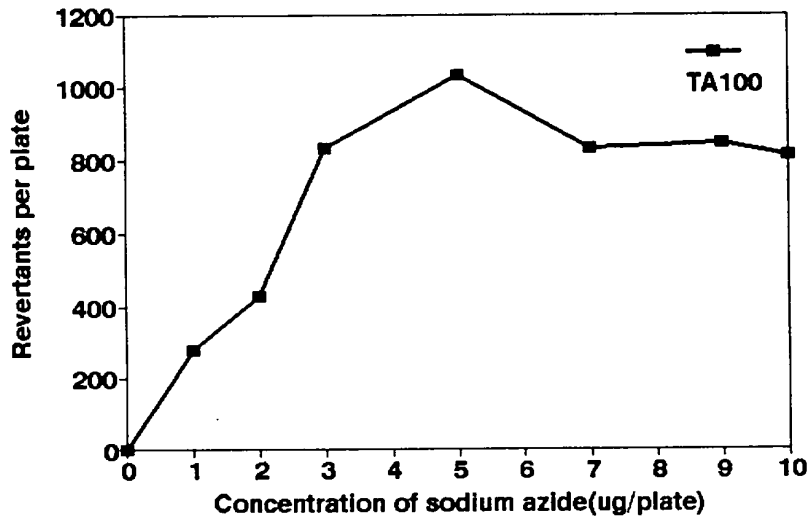


Fig. 6. Dose-response of sodium azide for TA100 (Spontaneous revertants are subtracted).

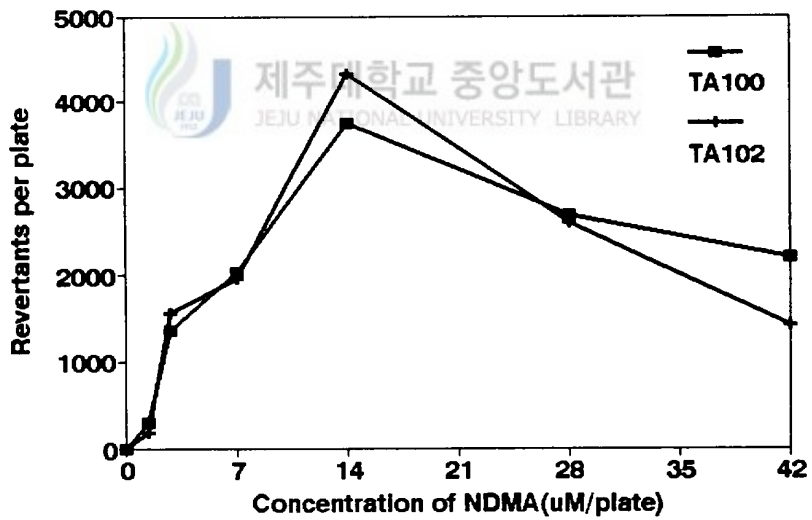


Fig. 7. Dose-response of NDMA for TA100 and TA102 (Spontaneous revertants are subtracted).

2. 용매별 추출물의 항돌연변이 효과

1) MMS에 대한 항돌연변이 효과

Table 3은 툯 용매별 추출물이 MMS에 의해 유도된 돌연변이 활성 억제효과를 나타낸 것이다. 툯을 몰로 추출물한 경우에는TA100과 TA102에서 표준 돌연변이 원인 MMS보다 revertant colony 수를 오히려 증가하는 경향을 보여 항돌연변이 효과를 나타내지 않았다.

에탄올 추출물은 투여량의 증가에 따라 revertant colony 수가 감소하였는데, 추출물을 100 μ l/plate 투여하였을 때 TA100과 TA102에서 각각 62와 57%의 돌연변이

Table 3. Desmutagenic effects of solvent extracts from dried sargassum on MMS-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA100 and TA102.

Treatment	Amount of extract (μ l/plate)	Revertants/plate	
		TA100	TA102
Spontaneous		122 \pm 3	283 \pm 3
Positive		1176 \pm 96	3450 \pm 97
MMS +	10	1351 \pm 39 (-)	4709 \pm 280(-)
Distilled water	100	1231 \pm 29 (-)	3577 \pm 208(-)
MMS + Ethanol	10	768 \pm 27 (35)	1873 \pm 12(46)
	100	444 \pm 85 (62)	1493 \pm 2 (57)
MMS + Ethyl ether	10	803 \pm 95 (32)	1441 \pm 120(58)
	100	662 \pm 48 (44)	1193 \pm 43 (65)
MMS + n-hexane	10	740 \pm 197(37)	1480 \pm 215(57)
	100	245 \pm 44 (79)	997 \pm 51 (71)

The amount of MMS used was 0.9mM per plate. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

MMS : methyl methanesulfonate.

Spontaneous revertants are subtracted.

이 억제효과를 나타내었다. 에틸에테르 추출물도 에탄올 추출물과 마찬가지로 투여량에 따른 억제효과가 나타났는데, 100 μ /plate를 투여하였을 때 TA100과 TA102에서 각각 44 및 65%의 억제효과를 나타내었다. 헥산 추출물은 100 μ /plate를 투여하였을 때 TA100 및 TA102에서 각각 79, 71%로 높은 억제효과를 나타내었다. Ohkawa 등(1993)은 건조톳 추출물을 수용성 분획과 불용성 분획으로 추출하여 항돌연변이 효과를 검토한 결과 불용성 분획에서 돌연변이원인 dinitropyrene에 대하여 매우 효과가 있다고 보고하였는데 본 결과는 이와 잘 일치하였다.

Table 4는 미역의 용매별 추출물이 MMS에 대한 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다.

Table 4. Desmutagenic effects of solvent extracts from dried sea-mustard on MMS-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA100 and TA102.

Treatment	Amount of extract (ul/plate)	Revertants/plate	
		TA100	TA102
Spontaneous		122 \pm 3	283 \pm 3
Positive		1176 \pm 96	3450 \pm 97
MMS + Distilled water	1	1314 \pm 146(-)	3532 \pm 23 (-)
	10	1198 \pm 45 (-)	3307 \pm 47 (4)
	100	1164 \pm 32 (-)	3136 \pm 56 (9)
MMS + Ethanol	1	1097 \pm 63 (7)	3216 \pm 21 (7)
	10	986 \pm 44(16)	2389 \pm 52(31)
	100	955 \pm 16(19)	2182 \pm 21(37)
MMS + Methanol	1	1196 \pm 80 (-)	3550 \pm 42 (-)
	10	1082 \pm 50 (8)	3268 \pm 32 (5)
	100	1038 \pm 27(12)	3004 \pm 32(13)
MMS + n-hexane	1	1169 \pm 11 (-)	3554 \pm 31 (-)
	10	1151 \pm 22 (-)	3248 \pm 45 (6)
	100	1068 \pm 11 (9)	3094 \pm 46(10)

The amount of MMS used was 0.9mM per plate. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

MMS : methyl methanesulfonate.

Spontaneous revertants are subtracted.

물 추출물은 TA100에서는 전혀 효과를 나타내지 않았고, 또한 TA102에서는 9%정도의 효과를 보이고 있을 뿐 거의 효과가 없었다. 에탄올 추출물은 100 μ l/plate 투여하였을 때 TA100과 TA102에서 각각 19 및 37% 정도의 미약한 효과를 보이고 있으며, 메탄올과 헥산 추출물에 있어서도 100 μ l/plate 투여하였을 때 양 균주에 대하여 약 10%이내의 낮은 억제효과를 보이고 있다. Ryu 등(1986)은 미역 용매별 추출물의 항돌연변이 효과를 검정한 결과 증류수, 메탄올, 에틸에테르 추출물은 다소의 효과를 보이고 있으나, 헥산의 경우 변이원물질에 대하여 높은 항돌연변이 효과를 보이고 있는데, 이는 추출 방법에 차이로 생각된다.

Table 5는 다시마 추출물이 MMS에 대한 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다.

Table 5. Desmutagenic effects of dried solvent extracts from sea-tangle on MMS-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA100 and TA102.

Treatment	Amount of extract (ul/plate)	Revertants/plate	
		TA100	TA102
Spontaneous Positive		122 \pm 3	283 \pm 3
		1176 \pm 96	3450 \pm 97
MMS + Distilled water	1	1390 \pm 22 (-)	3501 \pm 23 (-)
	10	1198 \pm 45 (-)	3072 \pm 47 (4)
	100	1109 \pm 9 (6)	3009 \pm 27(13)
MMS + Ethanol	1	966 \pm 35(19)	3420 \pm 54 (-)
	10	890 \pm 27(24)	3251 \pm 34 (6)
	100	875 \pm 10(26)	2967 \pm 30(14)
MMS + Methanol	1	1274 \pm 18 (-)	3511 \pm 68 (-)
	10	1081 \pm 61 (8)	3346 \pm 17 (-)
	100	1077 \pm 45 (8)	3170 \pm 11 (8)
MMS + n-hexane	1	1219 \pm 11 (-)	3372 \pm 50 (-)
	10	1135 \pm 76 (-)	3240 \pm 30 (7)
	100	1118 \pm 12 (5)	3002 \pm 78(13)

The amount of MMS used was 0.9mM per plate. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

MMS : methyl methanesulfonate.

Spontaneous revertants are subtracted.

물 추출물은 100 μ l/plate 투여하였을 때 TA100과 TA102 균주에서 각각 6 및 13%로 낮은 억제효과를 나타내었고, 에탄올 추출물은 26 및 14%, 메탄올과 헥산 추출물은 10%이내의 항돌연변이 효과를 보여 전반적으로 다시마의 에탄올 추출물은 항돌연변이 효과가 없는 것으로 판단된다.

결국 톳의 용매별 추출물은 MMS에 의해 유도된 돌연변이를 억제하는 효과가 있으나, 미역과 다시마 추출물은 MMS의 돌연변이 활성을 억제하지 못하는 것으로 판단된다.

2) ICR191 및 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과

Table 6은 미역, 다시마 및 톳의 용매별 추출물이 ICR191에 대한 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다.

각 용매별 추출물은 시료 농도의 증가에 따라서 revertant colony 수가 감소하는 경향을 보였는데 미역과 다시마의 물 추출물을 100 μ l/plate 투여하였을 때 ICR191의 돌연변이 활성은 각각 58 및 40%정도 억제하는 것으로 나타난 반면, 톳의 물 추출물은 100 μ l/plate 투여하였을 때 94%의 높은 억제효과를 나타내었다.

에탄올 추출물의 경우 미역, 다시마 및 톳 추출물을 각각 100 μ l/plate 투여하였을 때 78, 81, 94%로 가장 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었으며, 메탄올과 헥산 추출물의 경우, 미역과 다시마에서는 20~40%로 억제효과가 그다지 크지 않은 반면, 톳의 에틸에테르 및 헥산 추출물에서 각각 84, 61%의 억제효과를 보이고 있다. 이러한 결과는 Ohkawa 등(1993)이 톳 추출물이 미역과 다시마 추출물보다 항돌연변이 효과가 강하다는 보고와 일치하고 있다.

Table 7은 미역, 다시마 및 톳 추출물이 sodium azide에 대한 돌연변이 억제효과를 나타낸 것이다. 미역은 100 μ l/plate를 투여하였을 때 에탄올 추출물에서 24%의 억제효과를 나타냈으며, 톳은 에탄올 추출물에서 26% 정도의 억제효과를 나타내었다. 다시마는 에탄올 추출물에서 6% 정도의 억제효과를 보이고 있는데, 전 등(1994)은 쌀을 증류수, 헥산, 클로로포름, 메탄올 용매별로 추출하여 이들 추

출물의 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과는 메탄올 추출물에서 24%의 미약한 효과를 보인다고 보고하고 있다.

Table 6. Desmutagenic effects of different solvent extracts from dried sea-mustard, sea-tangle and sargassum on ICR 191-induced mutation in *Salmonella typhimurium* TA97.

Treatment	Amount of extract (μ l/plate)	Revertants/Plate		
		sea-mustard	sea-tangle	sargassum
Spontaneous Positive		139 \pm 8		
ICR 191 + Distilled water	1 10 100	984 \pm 14 (18) 812 \pm 20 (32) 496 \pm 7 (58)	1096 \pm 9 (8) 910 \pm 35(24) 713 \pm 15(40)	- 462 \pm 22(61) 74 \pm 23(94)
ICR 191 + Ethanol	1 10 100	1134 \pm 9 (5) 684 \pm 17 (43) 261 \pm 3 (78)	929 \pm 29(22) 665 \pm 36(44) 222 \pm 8 (81)	- 317 \pm 56(73) 72 \pm 5 (94)
ICR 191 + Methanol	1 10 100	1246 \pm 122(-) 848 \pm 32 (29) 717 \pm 3 (40)	1145 \pm 47 (4) 962 \pm 53(19) 842 \pm 6 (29)	- - -
ICR191 + Ethyl ether	10 100	- -	- -	725 \pm 83(39) 192 \pm 35(84)
ICR 191 + n-Hexane	1 10 100	985 \pm 97 (17) 945 \pm 15 (21) 841 \pm 4 (30)	1171 \pm 40 (-) 1131 \pm 35 (5) 943 \pm 17(21)	- 1029 \pm 60(14) 463 \pm 7 (61)

The amount of ICR191 used was 0.5 μ g per plate. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

ICR191; 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine.
Spontaneous revertants are subtracted.

3. 에탄올 농도별의 항돌연변이 효과

1) 툿 추출물의 항돌연변이 효과

Table 8은 툿의 에탄올 농도별 추출물이 MMS에 대한 항돌연변이 효과를 나타

낸 것이다. 툿 에탄올 추출물은 고농도의 에탄올로 추출할수록 항돌연변이 효과가 증가하였는데, 90% 에탄올 추출물의 경우 TA100과 TA102에서 MMS에 의해 유도된 돌연변이 효과를 각각 72 및 75%로 억제하였다.

Table 7. Desmutagenic effects of different solvent extracts from dried sea-mustard, sea-tangle and sargassium on sodium azide-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Amount of extract ($\mu\text{l}/\text{plate}$)	Revertants/Plate		
		sea-mustard	sea-tangle	sargassium
Spontaneous Positive		116 1033 \pm 63		
Sodium azide + Distilled water	1	930 \pm 8 (10)	1312 \pm 27(-)	-
	10	906 \pm 50(12)	1198 \pm 25(-)	1204 \pm 87 (-)
	100	803 \pm 45(22)	1024 \pm 4 (-)	1096 \pm 93 (-)
Sodium azide + Ethanol	1	965 \pm 24(12)	1128 \pm 8 (-)	-
	10	877 \pm 11(15)	1101 \pm 30(-)	934 \pm 33(10)
	100	790 \pm 18(24)	975 \pm 15(6)	768 \pm 95(26)
Sodium azide + Methanol	1	883 \pm 45(15)	1075 \pm 71(-)	-
	10	880 \pm 19(15)	1041 \pm 30(-)	-
	100	872 \pm 9 (16)	1030 \pm 13(-)	-
Sodium azide + Ethyl ether	10			1169 \pm 15 (-)
	100			964 \pm 26 (7)
Sodium azide + n-Hexane	1	904 \pm 12(13)	1206 \pm 47(-)	-
	10	825 \pm 14(20)	1088 \pm 22(-)	1122 \pm 23(-)
	100	826 \pm 31(20)	1066 \pm 5 (-)	1037 \pm 44(-)

The amount of sodium azide used was 5 μg per plate. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate}(\%) = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

Spontaneous revertants are subtracted.

툿 에탄올 농도별 추출물의 ICR191에 대한 항돌연변이 효과는 물 추출물을 100 $\mu\text{l}/\text{plate}$ 투여하였을 때 각각 95%의 억제효과로 투여량이 증가할수록 항돌연변이 효과가 높아지는 현상을 보였다. 30% 에탄올 추출물은 1 $\mu\text{l}/\text{plate}$ 투여하였을 때

는 항돌연변이 효과가 없지만 100 μ /plate 투여하였을 때는 억제효과가 97%로 높은 항돌연변이 효과가 나타났다. 50% 에탄올 추출물에서도 투여량이 많을수록 revertant colony 수가 감소하는 현상이 나타나고 있으며, 100 μ /plate 투여하였을 때 돌연변이 억제효과가 97%로 항돌연변이 효과가 강하였다. 90% 에탄올 추출물은 소량, 즉 1 μ /plate 투여시에도 81%의 억제효과를 나타내었으며 10, 100 μ /plate 투여시에는 각각 92, 98%로 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 Ohkawa 등(1993)이 톳 물 추출물을 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하여 항돌연변이를 실험한 결과 불용성 분획에서 강한 항돌연변이 효과가 있다고 보고한 것과 일치하고 있으며, 함 등(1994)이 메밀 잎 에탄올 추출물의 항돌연변이 효과를 실험한 결과 추출물을 1.6mg/plate를 투여하였을 때 85%의 항돌연변이 효과가 있다는 보고와 비슷하게 나타났다.

톳 추출물의 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과는 0, 30, 50% 에탄올 추출물에서는 항돌연변이 효과가 없으나, 70, 90%의 에탄올 추출물은 각각 41와 44%로 다소의 항돌연변이 효과가 있지만 실용성은 적다고 하겠다.

본 결과로 보아 톳 추출물의 경우 ICR191에 따라 항돌연변이 활성이 있으며, 특히 70, 90% 에탄올 추출물에서 소량의 추출물을 투여할 경우에도 80% 이상의 항돌연변이 효과를 나타내고 있어서, 이들 추출물은 앞으로 실용성이 높다고 하겠다. 그러나 sodium azide에 대해서는 효과가 없는 것으로 판단된다.

2) 미역 추출물의 항돌연변이 효과

Table 9는 미역 에탄올 추출물이 MMS, ICR191 및 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다.

각 농도에 따른 추출물을 100 μ /plate 투여하였을 때 10% 이내의 효과를 보이고 있으나 전반적으로 미역 에탄올 농도별 추출물들은 양성변이원물질인 MMS에 대하여 효과가 없는 것으로 생각되어진다.

미역 추출물의 ICR191에 대한 돌연변이 억제효과는 에탄올 농도가 증가할수록

다소 증가하는 경향을 보이고 있는데 90% 에탄올 추출물은 70%의 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 추출물의 투여량을 높일수록 억제효과도 다소 증가하였다.

Table 8. Desmutagenic effects of ethanol extracts from dried sargassum against MMS-, ICR191- and sodium azide-induced mutations in *Salmonella typhimurium* strains

Ethanol conc.(%)	Amount of extract (ul/plate)	Revertant/plate			
		MMS		ICR191	Sodium azide
		TA100	TA102	TA97	TA100
Spontaneous		122±3	283±3	139±8	116±2
Positive		1176±96	3450±97	1193±79	1033±63
0	1	1398±10 (-)	3503±50 (-)	1008±8 (16)	1056±41 (-)
	10	1326±17 (-)	3200±130(7)	386±85 (68)	1058±87 (-)
	100	1291±12 (-)	3077±52(11)	39±5 (95)	1028±58 (-)
30	1	1120±48 (5)	3192±25 (5)	1176±309 (-)	1139±23 (-)
	10	1071±38 (9)	3169±23 (8)	357±111(70)	1182±21 (-)
	100	930±21(21)	3142±29 (9)	36±3 (97)	997±11 (3)
50	1	1338±24 (-)	3747±62 (-)	841±70 (30)	1196±85 (-)
	10	1039±25(12)	3726±15 (-)	325±31 (73)	1108±143(-)
	100	884±13(25)	3594±5 (-)	45±4 (96)	992±25 (3)
70	1	1025±17(13)	2060±44 (40)	214±36 (82)	810±24(22)
	10	970±31(18)	2004±7 (42)	148±31 (88)	753±91(27)
	100	732±25(38)	1864±44 (46)	39±2 (97)	614±95(41)
90	1	750±41(36)	2292±82 (34)	226±50 (81)	815±97(21)
	10	585±9 (50)	2180±74 (37)	195±31 (92)	813±63(21)
	100	328±19(72)	867±114(75)	22±8 (98)	581±22(44)

The amount of MMS, ICR191, or sodium azide used was 0.9mM, 0.5µg, or 5µg per plate, respectively. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

ICR191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine;MMS, methyl methanesulfonate.

Spontaneous revertants are subtracted.

이러한 결과는 Ohkawa 등(1993)의 건조 툯의 물 추출물을 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하여 항돌연변이를 실험한 결과 불용성 분획에서 강한 항돌연변이 효과가 있다고 보고한 것과 일치하고 있다.

미역 에탄올 농도별 추출물의 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과는 90% 에탄올 추출물의 경우 26%의 항돌연변이 효과를 나타내고 있으나, 전반적으로 돌연변이 억제효과가 없어서 실용성이 없는 것으로 판단된다.

따라서 미역 에탄올 추출물은 ICR191에 대한 억제효과가 있으나 MMS와 sodium azide에 대한 억제효과는 없는 것으로 판단되며, 염기치환성 돌연변이원 보다는 오히려 구조이동성 돌연변이원에 대한 억제효과가 있는 것으로 생각된다.

Table 9. Desmutagenic effects of ethanol extracts from dried sea-mustard against MMS-, ICR191- and sodium azide-induced mutations in *Salmonella typhimurium* strains

Ethanol conc.(%)	Amount of extract (μl/plate)	Revertant/plate			
		MMS		ICR191	Sodium azide
		TA100	TA102	TA97	TA100
Spontaneous		122±3	283±3	139±8	116±2
Positive		1176±96	3450±97	1193±79	1033±63
0	1	1419±26 (-)	4989±187 (-)	1111±24 (7)	1058±23 (-)
	10	1226±36 (-)	3950±65 (-)	823±30(31)	1041±26 (-)
	100	1154±57 (-)	3721±33 (-)	614±31(48)	931±24 (9)
30	1	1498±40 (-)	4301±68 (-)	1071±9 (10)	1027±26 (-)
	10	1412±21 (-)	3693±212 (-)	596±60(50)	1019±12 (-)
	100	1092±55 (7)	2989±111(13)	501±26(58)	945±18 (9)
50	1	1419±26 (-)	4060±182 (-)	1056±12(12)	1024±23 (-)
	10	1295±98 (-)	4050±68 (-)	616±33(48)	1001±18 (-)
	100	1072±4 (9)	3716±180 (-)	520±19(56)	875±12(15)
70	1	1195±25 (-)	4182±220 (-)	1027±12(12)	1004±45 (-)
	10	1144±34 (-)	4069±212 (-)	554±49(54)	976±2 (6)
	100	953±61(19)	3089±58 (10)	405±33(66)	923±18(11)
90	1	1241±49 (-)	3533±48 (-)	1036±35(13)	849±23(18)
	10	1151±49 (-)	3398±104 (-)	557±15(53)	803±19(22)
	100	1089±30 (7)	3136±209 (9)	359±26(70)	759±20(26)

The amount of MMS, ICR191, or sodium azide used was 0.9mM, 0.5μg, or 5μg per plate, respectively. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

ICR191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine; MMS, methyl methanesulfonate.

Spontaneous revertants are subtracted.

3) 다시마 추출물의 항돌연변이 효과

Table 10은 다시마의 에탄올 농도별 추출물의 MMS, ICR191 및 sodium azide에 대한 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다. 추출물이 MMS에 대한 항돌연변이 효과는 20% 이하로 TA100과 TA102에서 돌연변이 억제효과가 없었다.

다시마 추출물이 ICR191에 대한 항돌연변이 효과는 10% 에탄올 추출물에서 49%의 억제효과를 나타내었고, 30% 이상의 에탄올 추출물은 70% 이상의 높은 항돌연변이 효과가 있었다. 이러한 결과는 Ohkawa 등(1992)의 다시마 증류수 추출물을 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하여 항돌연변이를 실험한 결과 불용성 분획에서 돌연변이 유발물질인 dinitripyrine의 돌연변이원성을 억제한다는 보고와 일치 하는 것이다.

다시마 에탄올 추출물이 sodium azide에 대한 돌연변이 억제효과는 10% 미만으로 돌연변이 억제효과가 없는 것으로 판단된다.

따라서 다시마 에탄올 추출물도 미역 추출물과 마찬가지로 ICR191에 대한 돌연변이 억제효과가 나타나고 있으나, MMS나 sodium azide에 대해서는 효과가 전혀 없는 것으로 생각는데, 다시마의 경우도 미역과 마찬가지로 염기치환성 보다도 구조이동성 돌연변이원에 대한 효과가 더욱 큰 것으로 생각된다.

4) NDMA에 대한 항돌연변이 효과

Table 11은 NDMA에 대한 미역 및 다시마 에탄올 농도별 추출물의 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다.

미역 물 추출물에서는 투여량이 증가하더라도 revertant colony 수의 뚜렷한 감소를 확인할 수 없어서 항돌연변이 효과를 인정할 수 없었으나, 30, 50, 70 및 90% 에탄올 추출물에서는 투여량이 많을수록 일정하게 감소하는 현상을 보이고 있다. 에탄올 농도별에 따른 TA100과 TA102의 관계에 있어서는 어떤 특징적인 효과를 찾아 볼 수 없었다. 그리고 고농도의 에탄올 용액에서 추출한 것일수록, 투여량이 많을수록 plate 당 revertant colony 수가 적게 나타나고 있다.

NDMA에 대한 다시마 에탄올 추출물의 항돌연변이 효과는 0, 30 및 50% 에탄

을 추출물에서는 균주의 종류나 에탄올 농도에 따른 특징적인 항돌연변이 효과를 찾아 볼 수는 없었고, 미역 추출물과 경향은 비슷하나 전반적으로 미역 추출물에 비해 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 그러나 70 및 90% 에탄올 추출물에서는 TA100에 대해서만 선별적으로 97% 이상의 높은 억제 효과를 보이고 있다. 따라서 다시마 70 및 90% 에탄올 추출물에서는 DNA 염기의 G-C 염기쌍의 methyl화를 저지하는 어떤 물질이 존재하는 것으로 추론된다.

Table 10. Desmutagenic effects of ethanol extracts from dried sea-tangle against MMS-, ICR191- and sodium azide-induced mutations in *Salmonella typhimurium* strains

Ethanol conc. (%)	Amount of extract (μl/plate)	Revertant/plate			
		MMS		ICR191	Sodium azide
		TA100	TA102	TA97	TA100
Spontaneous		122±3	283±3	139±8	116±2
Positive		1176±96	3450±97	1193±79	1033±63
0	1	1334±73 (-)	3533±21 (-)	1091±10(22)	1111±17(-)
	10	1307±74 (-)	3402±10 (-)	825±20(31)	1049±8 (-)
	100	1139±34 (3)	3288±92 (6)	602±21(49)	966±11(7)
30	1	1249±35 (-)	3581±91(-)	943±18(21)	1161±22(-)
	10	1183±46 (-)	3469±24(-)	489±7 (60)	1100±7 (-)
	100	1087±28 (8)	3343±44 (-)	327±7 (73)	949±22(8)
50	1	1175±61 (-)	3567±38 (-)	666±9 (44)	1040±4 (-)
	10	1157±59 (-)	3502±17 (-)	517±22(57)	1024±17(-)
	100	1066±26 (9)	3161±26 (8)	314±12(74)	945±29(9)
70	1	1234±64 (-)	3474±23 (-)	736±8 (38)	1119±33(-)
	10	1108±10 (6)	3186±32 (7)	738±21(38)	1022±41(-)
	100	955±49(19)	3003±5 (13)	312±19(74)	1249±24(-)
90	1	1214±29 (-)	3568±142(-)	766±19(36)	1249±24(-)
	10	1004±80(15)	3350±69 (-)	601±22(50)	1189±17(-)
	100	921±35(22)	3067±49(11)	291±19(76)	1076±3 (-)

The amount of MMS, ICR191, or sodium azide used was 0.9mM, 0.5μg, or 5μg per plate, respectively. The values in parentheses are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

ICR191, 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine; MMS, methyl methanesulfonate.

Spontaneous revertants are subtracted.

결과적으로 미역과 다시마 에탄올 농도에 따른 NDMA의 항돌연변이 효과를 *S. typhimurium* TA100과 TA102를 이용하여 단편적으로 항암효과를 검토한 결과 다시마 70 및 90% 에탄올 추출물에서만 균주에 따라 큰 차이를 보이고 있는 것은 흥미로운 일이며 이에 대한 보다 종합적인 검토가 필요하리라 본다.

Table 11. Destimutagenic effects of ethanol extracts from sea-mustard and sea-tangle on NDMA-induced mutations in *Salmonella typhimurium* TA100 and TA102

Ethanol conc.(%)	Amount of extract (μl/plate)	Revertant/plate			
		sea-mustard		sea-tangle	
		TA100	TA102	TA100	TA102
Spontaneous		135	267	135	267
Positive		1906	1819	1906	1819
0	1	1275(33)	1763 (3)	1425(25)	1713 (6)
	10	1629(15)	1696 (7)	576(70)	630(65)
	100	1094(43)	1009(45)	449(75)	436(76)
30	1	1574(17)	1518(17)	1846 (3)	1635(10)
	10	1525(20)	1075(41)	1576(17)	1607(12)
	100	394(79)	712(63)	996(48)	947(48)
50	1	1209(37)	1509(17)	1558(17)	1413(22)
	10	865(55)	1036(43)	1822 (4)	1510(17)
	100	685(64)	627(66)	579(70)	518(72)
70	1	1595(16)	1247(31)	40(99)	1842 (-)
	10	1009(47)	1377(24)	39(99)	1604(12)
	100	475(75)	851(53)	45(97)	151(92)
90	1	1233(35)	1219(33)	43(98)	909(50)
	10	716(62)	883(51)	43(98)	1140(37)
	100	420(78)	544(70)	48(97)	339(81)

Positive control : 7μM/plate of NDMA.

The values in parenthese are the inhibition rate(%).

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{Revertants of positive control} - \text{Revertants of sample}}{\text{Revertants of positive control}} \times 100$$

NDMA : N-nitrosodimethylamine.

Spontaneous revertants are subtracted.

4. 에탄올 농도별 추출물의 항균효과

1) 툇 에탄올 농도별 추출물의 항균효과

툇 에탄올 농도별 추출물의 항균성을 검색한 결과는 Table 12와 같다. 툇의 0, 30, 50% 에탄올 추출물들은 시험구 3종의 균주에 대하여서 항균성을 보이지 않았으나, 70과 90% 추출물들은 *E. coli*와 *B. subtilis*에 대하여 특히 *B. subtilis*에 대하여 강한 항균성을 보였다. 이는 박 등(1992b)이 자초를 에탄올 농도별로 추출하여 항균성을 검색한 결과 에탄올 농도가 높을수록 높은 항균성을 나타내었다고 보고한 것과 일치하고 있다. 특히 90% 추출물인 경우 disc당 고형물 함량이 70% 추출물에 비하여 약 3배가 적은 데도 불구하고 거의 동일한 항균성을 보이고 있는 것으로 보아, 90% 추출물에는 강한 항균성을 갖는 물질이 함유되어 있는 것으로 추정된다.

Table 12. Growth inhibition of ethanol extracts from dried sargassium against Microbes.

Ethanol conc. (%)	Clear zone on plate (mm)			Soluble solid content (mg/disc)
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
0	0	0	0	1.299
30	0	0	0	1.402
50	0	0	0	1.351
70	10.2	13.9	0	0.725
90	10.1	13.5	0	0.275

2) 건조 미역 및 다시마 에탄올 추출물의 항균효과

미역 및 다시마 추출물의 이용에 있어서 식품의 발효나 부패에 관여하는 미생물에 대한 영향력을 검토하기 위해 그람양성균인 *B. subtilis*, 그람음성균인 *E. coli*, 및 진핵생물로 *S. cerevisiae*를 사용하여 tube당 각 추출물을 1.5ml 투여하여

항균성을 검토한 결과는 Table 13에 나타내었다. 시료의 pH가 균체에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 사전에 미리 pH를 조절하였으며(*E. coli*, pH 7.5; *B. subtilis*, pH 6.8), 미생물은 각각의 최적성장 온도에서 배양하였다(*E. coli*, *B. subtilis*, 37°C; *S. cerevisiae*, 30°C).

미역 에탄올 추출물은 50% 에탄올 추출물에서 *S. cerevisiae*에 대하여 70.5%의 항균효과를 나타내었으나, 기타 *B. subtilis*와 *E. coli*에 대한 항균효과는 적은 것으로 나타났다. 반면, 다시마 에탄올 추출물은 *B. subtilis*에 대해서는 70 및 90% 에탄올 추출물에서 각각 93 및 75.7%, *E. coli*에 대해서는 70 및 90% 에탄올 추출물에서 각각 96.2 및 87.6%의 항균효과를 보였다. 그리고 *S. cerevisiae*에 대해서는 90% 추출물에서 74%의 항균효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 13. Growth inhibition effect of ethanol extracts from dried sea-mustard and sea-tangle against microbes

Ethanol conc. (%)	Growth inhibition(%) ¹⁾						Solid added per tube(mg) ²⁾	
	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. cerevisiae</i>		M	T
	M	T	M	T	M	T		
0	22.6	0.0	40.0	22.6	53.8	8.3	7.83	4.25
30	0.9	8.6	26.5	23.5	34.9	13.5	9.27	15.40
50	1.8	0.0	24.8	27.0	70.5	27.1	9.79	11.38
70	10.6	96.2	40.8	93.0	43.9	8.3	6.82	10.30
90	16.8	87.6	39.2	75.7	51.5	74.0	2.34	2.33

¹⁾ $Growth\ inhibition(\%) = \left(1 - \frac{O.D\ of\ growth\ culture\ with\ extract}{O.D\ of\ growth\ culture\ without\ extract}\right) \times 100$

²⁾ Added 1.5ml of each ethanol extracts per tube.
M, sea-mustard; T, sea-tangle

V. 요약

투스, 미역 및 다시마를 용매별, 에탄올 농도별로 추출하여 이들 추출물의 항돌연변이 및 항균성을 검색하였다.

투스 용매별 추출물의 MMS에 대한 항돌연변이 효과는 hexan 추출물에서 가장 높았고, ICR191에 대한 항돌연변이 효과는 에탄올 추출물에서 높은 항돌연변이 효과를 나타내었으나, sodium azide에 대한 억제효과는 없었다. 미역 및 다시마의 ICR191에 대한 항돌연변이 효과는 에탄올 추출물에서 가장 높았으며, MMS와 sodium azide에 대한 돌연변이 억제효과는 없는 것으로 나타났다.

투스 에탄올 농도별 추출물의 MMS에 대한 돌연변이 억제효과는 90% 에탄올 추출물에서 70% 이상이었고, ICR191에 대한 돌연변이 억제효과는 95% 이상으로 매우 높았으나, sodium azide에 대한 억제효과는 없었다. 다시마 추출물의 ICR191에 대한 돌연변이 억제효과는 30% 이상의 에탄올 추출물에서 70% 이상이었으나, MMS와 sodium azide에 대한 억제효과는 없었다. 특히 툃 추출물은 ICR191에 대하여 모든 에탄올 농도별 추출물에서 90% 이상의 매우 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 미역 및 다시마 에탄올 추출물의 NDMA에 대한 돌연변이 억제효과는 모든 추출물에서 70% 이상이었으며, 전반적으로 다시마 추출물이 미역 추출물보다 높았다. 특히 70 및 90% 추출물은 *S. typhimurium* TA100에서 97% 이상의 항돌연변이 효과가 있었다.

에탄올 농도별 툃의 추출물들에 대한 항균성 검색 결과 70과 90% 추출물들이 *E. coli*와 *B. subtilis*에 대하여 뚜렷한 항균효과를 나타내었다. 미역과 다시마의 항균효과는 미역 추출물 보다 다시마의 추출물이 더욱 효과적이었다. 미역 추출물은 50% 추출물만이 *S. cerevisiae*에 대한 성장저지효과를 나타낸 반면, 다시마 추출물은 90% 에탄올 추출물에서는 시험된 모든 공시균주에 대하여, 그리고 70% 에탄올 추출물에서는 *E. coli*와 *B. subtilis*에 대하여 높은 성장저지효과를 나타내었다.

참고문헌

- Ahn, B.Z., 1989. Antitumor activity of some natural and synthetic flavones against L1210 and s-180 cells. Proc. Int. Sym. #5 on New Drug Development from Natural Products, Seoul, Korea.
- Ames, B.N., W.E. Duston, and F.D. Lee, 1973. An improve bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70(3), 782~786.
- Ames B.N., J. McCann and Yamasaki, 1975. Methods for detecting carcinogens the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31, 347~364.
- Ames, B.N., 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204, 587~595.
- Ashton, D.H. and F.F. Busta. 1968. Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus* by iron, calcium and magnesium. *Appl. Microbiol.*, 16, 628~633.
- Ayako, Y., Y. Koichi and O. Keiichi, 1982. Iodine distribution in blades of several Laminarias grown in the same sea area. *Nippon Susan Gakkaishi*, 58 (7), 1373~1379.
- Bailey, G.S. and D.E. Williams, 1993. Potential mechanisms for food-related carcinogens and anticarcinogens. *Food Technology*, 105~118.
- 백창원, 함승시, 1990a. SOS Chromotest에 의한 사과 효소갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지*, 22(6), 618~624.
- 백창원, 함승시, 1990b. 사과 Polyphenol Oxidase에 의한 효소갈변반응 생성물의 항돌연변이 효과. *한국식품과학회지*, 22(6), 625~631.
- Beuchat, L.R. and D.A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.*, 43, 134~142.

- 백경아, 박건영, 1993. 1. 김치 추출물의 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회 추계 학술발표회 초록, p. 41
- Callais, F., S. Min, S. Giorgi-Renault and B. Festy, 1991. Structure-activity relationships of a series of antitumoral 5,8-quinazolines in mutagenicity studies. *Mutation Res*, 261, 51~56.
- 최진호, 임채환 김재연, 양종순, 최재수, 1986. 식물섬유로서의 알긴산의 비만억제 효과: 비만치료식 개발을 위한 기초연구, 한국수산학회지, 19(4), 303~311.
- Cox, N.A., A.J. Mercuri, B.J. Juven, J.E. Thomson, and V. Chew. 1974. Evaluation of succinic acid and heat to improve the microbiological quality of poultry meat. *J. Food Sci.*, 39, 985~987.
- Crebelli, R., S. Fuselli, G. Conti, L. Conti. and A. Carere., 1991. Mutagenicity spectra in bacterial strains of airborne and engine exhaust particulate extracts. *Mutation Res.*, 261, 237~248.
- Forster, R., S.D. Blowers, S. Cinelli, H. Marquardt and J. Westendorf., 1992. Mutagenicity testing of imidazole and related compounds. *Mutation Res.*, 298, 71~79.
- Gary, J.I., and J.R. Dugan, 1975. Inhibition of *N*-nitrosamine formation in model foods systems. *J. Food Sci.* 40, 981~984.
- Garner, R.C., E.C. Miller and J.A. Miller, 1972. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B to a reactive toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Res.*, 32, 2058~2066.
- Guttenplan, J. B., 1984. Effect of pH and structure on the mutagenic activity of *N*-nitroso compounds. In: *Genotoxicology of N-Nitroso compounds*. T.K. Rao, W. Lijinsky and J.L. Epler(Eds.), Plenum Press, New York and London, 1, 59~90.
- 한재금, 고진복, 1986. 미역 첨가급식이 흰쥐의 간 및 혈청의 지질농도에 미치는 영향, 한국영양식량학회지, 1, 17~23.

- 함승시, 최근표, 최용순, 이상영, 1994. 메밀 Flavonoids의 항돌연변이원성 및 지질 대사 조절기능에 관한 연구. -메밀 잎 에탄올 추출물의 항돌연변이원성 연구- 한국영양식량학회지, 23(4), 698~703.
- 함승시, 홍은희, 大村浩久, 1987. 재래종 적색자두(*Prunus salicina*) 효소갈반응 생성물의 돌연변이 억제작용. 한국식품과학회지, 19(3), 212~219.
- 吉村彩子, 大石圭一, 1973. 昆布葉體の無機成分の分布, 日本水産學會誌, 39(3), 317.
- Helser, A.H. and J.H. Hotchkiss, 1994. Comparision of tomato phenolics and ascorbate fraction on the inhibition of *N*-nitroso compound formation. *J. Agric. Food Chem.* 42,129~132.
- Hodge J.F., F.D. Millis. and B.E. Fisher, 1972. Compounds of browned flavor derived from sugar-amino reaction. *Cereal. Sci. Today.* 17, 34~40.
- Isono, K. and J. Yourno, 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: *Salmonella* DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 1612~1617.
- Ito, H. and M. Sugimura, 1976. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thunbergii*. *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 1114~1115.
- Kada, T., K. Morita and T. Inoue, 1978. Antimutagenic action of vegetable factor on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.*, 53, 351~353.
- Kada, T., K. Kaneko, T. Matsusuzaki, and Y. Hara, 1985. Detection and chemical identification natural bio-antimutagens : A case of the green tea factor. *Mutation Res.*, 150, 127.
- Kato, H., I.E. Lee, N.V. Chuyen, S.B. Kim and F. Hayase, 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, 51(5), 1333~1338.
- Kim, S.B., Y.H. Park, F. Hayase and H. Kata, 1986. Desmutagenic effects of Maillard reaction products against mutagenic heterocyclic amines. *Bull.*

- Korean Fish Sci.*, 19(2), 127~135.
- 김혜영, 김영진, 김길환, 1993. 쌀의 부위별 항돌연변이 효과. 한국식품과학회 51차 학술발표회초록집, p. 64.
- Krivobok, S., F. Seigle-Murandi, R. Steiman, D.R. Marzin and V. Betina., 1992. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames *Salmonella* microsome system. *Mutation Res.*, 279, 1~8.
- Koch, W.H., E.N. Henrikson, E. Kupchella and T.A. Cebula, 1994. *Salmonella typhimurium* TA100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity, *Carcinogenesis*, 15(1), 79~88.
- Lai, C.N., M.N. Butler and T.S. Matney, 1980. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Res.*, 77, 245~250.
- Lee, I.R., 1989. Studies on the components and biological activities of *Duchesnea Indica*. Proc. 2nd Int. on Recent Advance on Natural Products Research, Seoul, Korea.
- 이경임, 이숙희, 김정옥, 정해영, 박건영, 1993. 들깨잎 추출물의 항돌연변이 및 항산화 효과. 한국영양식량학회지, 22(2), 175~180.
- 이선미, 이숙희, 박건영, 1993. 1. 십자화과 채소류의 항돌연변이 효과. 2. 케일즙의 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회 추계학술발표회초록집, p.40
- 이병완, 신동완, 1991a. 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성물질의 검색. 한국식품과학회지, 23(2), 200~204.
- 이병완, 신동완, 1991b. 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성물질의 농도별 및 분획별 항균 특성. 한국식품과학회지, 23(2), 205~211.
- 이강호, 유강진, 정인한, 1983. 염장미역의 가공 및 저장조건, 한국영양식량학회지, 12(2), 66~72.
- 이종우, 성낙주, 1980. 해조류의 무기성분, 한국영양식량학회지, 12(2) 51.
- Levin, D., M. Hollstein, M. Chistman, E. Schwiers, and B.N. Ames. 1982a. A

- new *Salmonella* tester strain(TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 19, 7445~7449.
- Levin, D., E. Yamasaki and B.N. Ames, 1982b. A new *Salmonella* tester strain for the detection of frameshift mutagens. *Mutation Res.*, 94, 315~330.
- Magee, P.N. and J.M. Barnes, 1956. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer*, 10, 114~122.
- Maron, D.M. and B.N. Ames, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 175~215.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki, and B.N. Ames, 1975a. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 Chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 5135~5139.
- McCann, J., N.E. Springarn, J. Kobori, and B.N. Ames, 1975b. Detection of carcinogens as mutagens bacterial tester strains with R-factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 979~983.
- Mirvish, S.S., 1970. Kinetics of dimethylamine nitrosation in reaction to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 44, 633.
- Mirvish, S.S., L. Walcave, M. Eagen and P. Shubik, 1972. Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic *N*-nitroso compounds. *Science*, 177, 65~68.
- Moon, C.K., K.S. Shim, S.H. Lee, K.S. Park, Y.P. Yun., B.J. Ha, and C.C. Lee, 1983. Antitumor activity of some photobased polysaccharides and their effects on the immune function. *Arch. Pharm. Res.*, 8(1), 42~44.
- 村上浩紀, 1978. 食糧成分中の抗腫瘍物質, 變異原 毒性. 4, 44~54.
- Nagao. M. and T. Sugimura, 1983. Suppression and enhancement of the mutagenicity of coffee. In: *Carcinogens and Mutagens in the Environment*, Vol.

- II. Naturally Occurring Compounds Endogenous Formation and Modulation. (Ed.), CRC Press INC, pp. 101~106.
- Neiman, C. 1985. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganism. *Bacteriol. Rev.*, 18, 147~154.
- Nielsen, P.A., A. Lagersted, S. Danielsen, A.A. Jensen, J. Hart and J. Larsen, 1992. Mutagenic activity of nine N,N-disubstituted hydrazines in the *Salmonella*/mammalian microsome assay. *Mutation Res.*, 278, 215~226.
- 日本公正書協會, 1986. 日本薬局方解説書(下). 鑛川書店, D-117.
- 森廣枝, 1983. 海藻の生化学と利用. 日本水産學會編, 恒星社厚生閣刊, pp. 33~45.
- 西澤一俊, 1984. 海洋バイオマスによる燃料油生産する調査成果報告書, 第6部品回収システム. 社會法人 海洋開發産業協會, 社團法人 醱酵工業協會, pp. 7~27.
- Noda, H., H. Amano, K. Arshima, S. Hashimoto and K. Nisizawa, 1989. Studies on the antitumor activity of marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(7), 1259~1264.
- Oguni, I., I. Tomita, and Y. Nakamura, 1988. Some evidence that green tea may play a role in the prevention of tumor development. Taiwan Tea Sym., 28
- 大川いづみ, 鈴木たね子, 1992. マコンブの變異原性抑制效果. 日本食衛誌, 33(6), 593~598.
- 大川いづみ, 鈴木たね子, 1993. 各種食用海藻の變異原性抑制效果. 日本食衛誌, 34(2), 120~127.
- Okutani, K., 1974. Antitumor activity of polysaccharide preparation from marine bacteria. *Technol. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 75~77.
- Ong, T.M., W.Z. Whong, J. Stewart, and H.E. Brockman, 1986. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutation Res.*, 173, 111~115.
- Oshima, H. and T. Kawabata, 1977. Mechanism of the N-nitrosodimethylamine

- formation from trimethylamine. *Bull. Japan. Soc. Fish.*, 44(1), 77~81.
- 박옥연, 장동석, 조학래, 1992a. 한약제 추출물의 항균효과 검색. *한국영양식량학회지*, 21(1), 91~97.
- 박옥연, 장동석, 조학래, 1992b. 자초 추출물의 항균 특성. *한국영양식량학회지*, 21(1), 97~100.
- Pegg, A.E., 1983. Alkylation and subsequent repair of DNA after exposure to diethylnitrosamine and related compounds. *In: Reviews in Biochemical Toxicology*, E. Hogdson, J.R. Bend and R.M. Philpot(Eds.), Vol. 5, Elsevier, New York, 83~133.
- Prival, J.M., V.F. Simmon and K.E. Mortelmans, 1991. Bacterial mutagenicity testing of 49 food in gradients gives very few positive results. *Mutation Res.*, 260, 321~329.
- Rositto, G., 1985. Pharmacological and clinical study of a new seaweed extract registered in the Italian pharmacopeia as Agasol T331. Milano, pp. 15~19.
- Ryu, B.H., B.H. Choi, D.S. Kim and M.S. Ha, 1986. Desmutagenic effect of extract obtained from seaweeds. *Bull. Korean Fish Soc.*, 19(5), 502~508.
- Ryu, B.H., D.S. Kim, K.J. Cho, and D.B. Sin, 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 21(5), 595~600.
- Sahika, E.A. and K. Mehmet. 1986. Sensitivity of some common food poisoning bacteria to thyme, mint and bay leaves. *Inter. J. Food Microbiol.*, 3, 349~352.
- Sato, T., Y. Ose and H. Nagase, 1986. Desmutagenic effect of humic acid. *Mutation Res.*, 162, 173~178.
- Scanlan, R.A., 1975. *N*-nitrosamines in food. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 5, 357~402.
- Shinohara, K., T. Fukuda, K. Iino and Z.I., Kong, 1991a. Effect of aqueous dialyzates of some freeze-dried vegetables on the mutagenicity of Trp-

- P-2 toward *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38(3), 235~241.
- Shinohara, k., Z.L. Kong, T. Fukuda and K. Iino, 1991b. Desmutagenic actions of partially fractionated dialyzate of spinach on Trp-p-2. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38(3), 242~248.
- Sugimura, T. 1982. Mutagens, carcinogens, tumor promoters in our daily foods, *Cancer Res.*, 49, 1970~1984.
- Tricker, A.R. and R. Preussmann, 1991. Carcinogenic *N*-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential, *Mutation Res.*, 259, 277~289.
- Ueda, S., Y. Kuwabara, N. Hirai, H. Sasaki and T. Sugahara, 1991. Anti-mutagenic capacities of different kinds of vegetables and mushrooms. *Nippon shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38(6), 507~514241.
- Wattentenberg, L.W., 1990. Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 32, 461~163.
- Yahagi, T., M. Nagao, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada, 1977. Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutation Res.*, 48, 121~130.
- Yamamoto, Y., K. Hiashi, and H. Yoshi. 1984. Inhibitory activity of acetic acid on yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 31, 772~776.
- Yang, H.S., J.D. Okun and M.C. Archer, 1987. Nonenzymatic microbial acceleration of nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.*, 25(5), 1181~1183.

감사의 글

본 논문의 완성되기까지 열과 성을 다하여 성심껏 지도하여 주신 김수현 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

그리고 항상 격려와 조언을 아낌없이 주신 송대진 교수님, 임상빈 교수님, 부족한 점이 많은 저를 사랑과 격려속에 용기를 주신 김재하교수님, 강영주 교수님, 하진환 교수님, 고영환 교수님들께도 깊은 감사를 드립니다.

또한 본 연구가 이루어지도록 주위에서 물심양면으로 도와주신 오창경 선배님, 오명철 선배님, 정완석 선배님, 김효선 선배님과 본 논문이 나오기 까지 함께 고생한 식품화학 실험실 후배들에게도 깊은 감사를 드립니다.

끝으로 학업을 마칠 수 있도록 돌봐주신 아버님, 어머님, 누님, 형님, 동생과 친구들에게 깊은 감사를 드리고 이 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

