

미역과 다시마 에탄올 추출물의 항돌연변이 및 항균효과

오창경 · 오명철 · 김성홍* · 임상빈 · 김수현
제주대학교 식품공학과, *제주도보건환경연구원

Antimutagenic and Antimicrobial Effect of Ethanol Extracts from Sea-mustard and Sea-tangle

Chang-Kyung OH, Myung-Cheol OH, Sung-Hong KIM*, Sang Bin LIM and Soo-Hyun KIM

Department of Food Science and Technology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

*Cheju-Do Provincial Government Institute of Health and Environment, Cheju 690-170, Korea

Antimutagenic and antimicrobial effects of the ethanol extracts from sea-mustard and sea-tangle were investigated. Antimutagenic effects of ethanol extracts from sea-tangle were higher than those of sea-mustard. Seventy and ninety percent ethanol extracts from sea-tangle showed high antimutagenic effects on NDMA-induced mutations in TA100 and TA102. Fifty percent of ethanol extract from sea-mustard showed high antimicrobial effect against *S. cerevisiae*, while 70 and 90% ethanol extracts from sea-tangle against *B. subtilis* and *E. coli*.

Key words : Sea-mustard, sea-tangle, antimutagenic and antimicrobial effect, NDMA-induced mutations

서 론

Nitrosodimethylamine (NDMA)을 비롯한 dialkylnitrosamine은 강력한 발암물질로써 혼합기능 산화효소계에 의존되는 cytochrome P-450의 α -hydroxylase의 작용으로 대사 활성화되어 독성, 암유발성 및 돌연변이 유발성 중간물질인 alkonium이온으로 전환된 후 암을 일으키게 된다 (Ariyoshi et al., 1982; Guttenplan, 1984). 이러한 난치의 병인 암은 치료보다는 예방에 중점을 두는 것이 바람직하며, 항암제나 방사선 요법 등이 인체에 독성을 나타냄을 고려할 때 부작용이 없거나 또는 심각한 부작용을 수반하지 않는 천연물로부터의 항암제 개발이 요구되어진다.

해조류는 화학적으로 특징적인 점질성 다당류를 다량 함유하고 있는데, 이들 다당류는 생리활성작용이 있는 것으로 알려지고 있다 (Noda et al., 1989; Rositto et al., 1985). 해조류의 항암성에 관한 연구로는 녹조류, 갈조류, 홍조류 등의 해조류에 대한 항암성분 (Nakazawa et al., 1976; 中澤 등, 1976) 및 항암효과 (西澤, 1984), 해조 다당류에 대한 연구 (Rositto, 1985; Sasaki et al., 1987) 등이 있다. 그런데 해조류 추출물의 항돌연변이 효과에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나, 이들은 모두 용매 추출물 전체의 효과 유무만을 단편적으로 밝히고 있다.

따라서 본 연구에서는 제주지역에 다양하게 분포되어 있는 천연 동식물자원에서 항암 및 항균성 생리활성물질을 검색하여 김치를 비롯한 우리 전통발효식품 제조 및

이용 중에 생성되기 쉬운 NDMA (Kim et al., 1985) 등의 발암물질 생성 방지 및 생체방어 물질로서의 이용 가능성을 검토하고자, 단편적으로 항암효과가 있는 것으로 알려진 미역과 다시마 (西澤, 1984)를 대상원료로 하여 에탄올 농도별로 시료를 추출하여 항돌연변이 및 항균효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재 료

미역과 다시마는 제주시내 동문시장에서 구입한 건조품을 40°C에서 2시간 동안 재차 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하여 70 mesh 이하의 것을 추출용 시료로 사용하였다.

시료의 추출

시료의 추출은 수직으로 환류냉각관을 부착시킨 2구 환저플라스크에 분쇄 미역과 다시마를 각각 20g과 각 농도별로 에탄올 (99v/v%, Hayman Ltd., USA)을 500ml 가 하고, 40°C에서 3시간 동안 추출하여 얻은 액을 두겹 가 체로 여과한 후 Toyo No. 5A로 감압여과하였다. 이 여액을 40°C에서 회전 진공증발농축기로 농축, 건조한 후 증류수를 가하여 100ml로 정용하고, 다시 Whatman GF/C로 여과하여 항돌연변이 및 항균성 시험시료로 사용하였다.

추출수율

추출물의 고형분 수율은 추출물 10ml를 각각 3회 취

하여 105°C에서 건조시킨 후 증발잔사의 양을 시료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

돌연변이원성 검정

본 연구에 사용된 돌연변이원인 NDMA는 DNA에 대한 염기치환성 상해를 주는 화학물질이기 때문에 (Yahagi et al., 1977), Ames 균주 중 DNA의 G-C 염기쌍의 염기치환 화합물의 검출에 민감한 *Salmonella typhimurium* TA100과 A-T 염기쌍의 염기치환 화합물의 검출에 민감한 TA102 (Levin et al., 1982a)를 검색용 균주로 사용하였다. 시험균주는 *S. typhimurium* TA100과 TA102로서 정기적으로 histidine 요구성, deep rough 특성, UV 감수성 및 R-factor 존재 등의 유전형질을 확인한 후 사용하였다.

S9의 조제는 Maron과 Ames (1983)의 방법에 따라 간 효소를 유도하기 위해 약 200g의 雄性 Sprague-Dawley rat에 Aroclor-1254를 200 mg/ml 농도로 옥수수기름에 녹여 쥐 kg당 500 mg을 복강주사하였다. 4°C의 무균상태에서 간을 적출하여 0.15M KCl (3ml/g liver)과 함께 균질화한 후 9,000g에서 10분간 원심분리하여 S9 획분을 얻었다.

돌연변이 실험은 Ames의 표준평판배지법을 개량한 Yahagi 등 (1977)의 preincubation법에 따라 *S. typhimurium* TA100과 TA102 균주를 이용하여 물을 용매로 NDMA의 돌연변이원성을 검정하였다. 그리고 NDMA는 대사활성화를 요구하기 때문에 S9 mix를 첨가하여 실험하였다.

항돌연변이 효과 검정

미역과 다시마 추출물이 NDMA에 의해 유도되는 돌연변이에 대한 억제효과를 검토하기 위하여 *S. typhimurium* TA100과 TA102를 이용하여 미역과 다시마를 10, 30, 50, 70 및 90% 에탄올로 추출하여 NDMA에 의해 유도되는 돌연변이에 대한 이들 추출물의 억제효과를 검토하였다.

항균성 검정

미역과 다시마 추출물에 의한 미생물 생육저지능 유무를 확인하기 위하여 원핵생물로 그람음성균인 *Escherichia coli*, 그람양성균인 *Bacillus subtilis*, 진핵생물로 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하여 탁도법으로 항균성 유무를 측정하였다. 즉 stock culture를 1백금이 취해 5ml의 액체배지에 접종하여 1~2일간 배양하였다. 신선한 배지 5ml를 함유한 시험관에 시료와 상기 배양액 0.1 ml를 넣고 37°C (*S. cerevisiae*는 30°C)에서 24시간 배양한 후 620 nm에서 각 배양액의 흡광도를 측정하여 생육저

지효과를 확인하였다. 미생물 배양용 배지는 *E. coli*의 경우 Luria Bertani 배지, *B. subtilis*의 경우 Nutrient agar, 그리고 *S. cerevisiae*인 경우 Yeast-Malt 배지를 각각 사용하였다. 피검색 시료는 사용전에 0.45µm의 membrane filter로 여과 멸균하였고, 시료의 pH가 균체에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 사전에 시료의 pH를 조절하였다 (*E. coli*, pH 7.5; *B. subtilis*, pH 6.8).

결과 및 고찰

미역과 다시마 추출물의 추출수율

미역과 다시마를 에탄올 농도별로 추출하여 추출수율과 고형분 함량을 Table 1에 나타내었다. 미역의 경우 추출수율은 에탄올 농도 50%까지는 추출수율이 증가하다가 에탄올 농도를 더 증가시켰을 때 감소하였다. 다시마는 에탄올 농도 30%까지는 추출수율이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다. 에탄올 농도 30% 이상에서는 다시마 추출물이 미역 추출물보다 추출수율이 높았다. 한편 동량의 시료에 대한 항돌연변이원성과 항균효과를 비교, 검토하기 위하여 추출물의 ml당 고형분 함량은 무관하게 추출 시료의 10배율 희석액, 즉 plate당 0.1, 1.0, 10, 100µl에 대하여 항돌연변이원성을 검정하였다.

Table 1. Extraction yield and soluble solid of ethanol extracts from dried sea-mustard and sea-tangle

Ethanol conc. (%)	Extraction yield (w/w%)		Soluble solid (mg/ml)	
	Sea-mustard	Sea-tangle	Sea-mustard	Sea-tangle
10	24.7	14.2	49.2	28.3
30	31.0	51.5	61.8	102.7
50	32.8	38.1	65.3	75.9
70	22.8	34.4	45.4	68.6
90	7.8	7.8	15.5	15.5

NDMA의 돌연변이원성 검정

S. typhimurium 균주 중 DNA 염기의 G-C 염기쌍에 작용하는 물질에 대한 검정용인 TA100과 A-T 염기쌍에 작용하는 물질에 대한 검정용인 TA102를 시험용 균주로 하여 NDMA의 돌연변이 활성을 검정한 결과는 Fig. 1과 같다. Nitrosamine은 DNA의 염기에 손상을 주거나 치환되어 암을 유발시킨다 (Levin et al., 1982a,b; Guttenplan and Hu, 1984; Negishi and Hayatus, 1980). Yahagi 등 (1977)에 의하면 nitrosodiethylamine (NDEA) 이외에는 구조이동성 돌연변이 균주인 TA98에 대하여 돌연변이

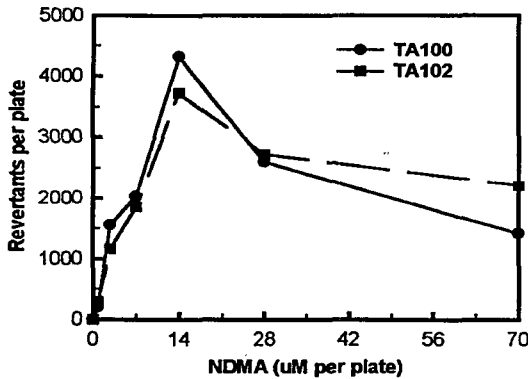


Fig. 1. Dose-response of nitrosodimethylamine for TA100 and TA102. (Spontaneous revertants are subtracted).

활성을 나타내지 않기 때문에 구조이동성 돌연변이원 검정용인 TA97과 TA98에 대해서는 검토하지 않았다.

14μM/plate 이하의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 돌연변이 활성이 직선적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 돌연변이 활성이 감소하였다. NDMA는 TA100과 TA102에 대해서 14μM/plate 첨가시에 plate당 revertant colonies 수가 각각 3,735와 4,317로 가장 높은 돌연변이 활성을 나타내었다. 따라서 NDMA의 dose-response 곡선에서 직선적으로 revertant colonies 수가 증가하는 부분에 있는 농도인 7μM/plate를 항돌연변이 효과 검정을 위한 양성반응물질의 농도로 사용하였다.

미역과 다시마 추출물의 항돌연변이 효과

미역과 다시마 에탄올 농도별 추출물을 이용하여 nitrosamine이 암유발 억제효과를 검토하기 위하여 nitrosamine 중에서 가장 강력한 발암물질로 알려지고 있는 NDMA를 대상물질로 하여 DNA 염기의 G-C 염기쌍에 작용하는 화학물질에 민감한 *S. typhimurium* TA100과 A-T 염기쌍에 작용하는 화학물질에 민감한 TA102를 이용하여 미역의 에탄올 농도별 추출물의 항돌연변이 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다.

미역의 10% 에탄올 추출물은 투여량의 증가에 따른 revertant colony 수의 감소를 확인할 수 없어서 NDMA에 대한 항돌연변이 효과가 없는 반면, 30% 이상의 에탄올 추출물에서는 투여량의 증가시킴에 따라 revertant colony 수가 감소하는 것으로 보아 항돌연변이 효과가 있는 것으로 추정된다. 그리고 추출용매의 에탄올 농도가 높을수록 투여량에 따른 revertant colonies 수가 감소되고 있어서 고농도의 에탄올로 추출하는 것이 효과적으로 판단된다. 그러나 70% 에탄올 추출물은 TA100을 이용한 시험에서 추출물을 10μℓ 투여하였을 때 특이하게

Table 2. Antimutagenic effects of ethanol extracts from sea-mustard on nitrosodimethylamine-induced mutations in *S. typhimurium* TA100 and TA102

Ethanol conc. (%)	Strain	Amount of extract added (μℓ/plate)				
		0*	0.1	1.0	10	100
10	TA100	1906	1584	1275	1629	1094
	TA102	1819	1538	1763	1696	1009
30	TA100	1906	1481	1574	1525	394
	TA102	1819	1257	1509	1036	627
50	TA100	1906	1314	1290	865	685
	TA102	1819	1800	1508	1075	627
70	TA100	1906	1526	1595	1009	475
	TA102	1819	1657	1247	1377	851
90	TA100	1906	1296	1233	716	420
	TA102	1819	1468	1219	883	544

* Positive control : 7.0μM of NDMA per plate. Spontaneous revertants are subtracted.

Table 3. Antimutagenic effects of ethanol extracts from sea-mustard on nitrosodimethylamine-induced mutations in *S. typhimurium* TA100 and TA102

Ethanol conc. (%)	Strain	Amount of extract added (μℓ/plate)				
		0*	0.1	1.0	10	100
10	TA100	1934	1741	1425	576	449
	TA102	1839	1733	1713	630	436
30	TA100	1934	1755	1846	1576	993
	TA102	1839	1737	1635	1635	947
50	TA100	1934	1541	1558	1822	579
	TA102	1839	1468	1413	1510	518
70	TA100	1934	42	40	39	45
	TA102	1839	1478	1842	1604	151
90	TA100	1934	46	43	43	48
	TA102	1839	984	909	1140	339

* Positive control : 7.0μM of NDMA per plate. Spontaneous revertants are subtracted.

revertant colonies 수가 증가하는 현상을 보였는데, 이는 실험적인 오차로 생각된다. 그리고 전반적으로 TA100과 TA102는 서로 비슷한 경향을 보이고 있다.

NDMA에 의해 유도되는 돌연변이에 대한 다시마의 에탄올 농도별 추출물의 항돌연변이 효과는 Table 3에 나타내었다. 10~50% 에탄올 추출물은 투여량을 증가시킬수록 revertant colonies 수가 조금씩 감소하는 것으로 보아 다소 NDMA에 대한 항돌연변이 효과가 있는 것으로 보이며, 10% 에탄올 추출물이 30과 50% 에탄올 추출물에 비해 높은 효과를 나타내는 것으로 보아 다시마의 수용성 성분이 돌연변이 억제에 기여하는 것으로 판단된다. 그러나 다시마의 70과 90% 에탄올 추출물은 모두 TA100에서 revertant colony 수가 40여개로 97% 이

상의 높은 항돌연변이 효과를 보이고 있어서 이들 다시마 추출물에는 DNA 염기의 G-C 염기쌍의 상해를 저지하는 어떤 물질이 존재하는 것으로 추론되며, 또한 70% 이상의 에탄올 농도에서 추출하는 것이 유효 항돌연변이 성분 추출에 매우 효과적인 듯하다. 따라서 항돌연변이가 현저한 이들 추출물에 함유되어 있는 유효 항돌연변이 인자의 추적이나 기타 발암물질에 대한 효과 등에 대한 보다 종합적인 검토가 필요하다. 한편 다시마의 70과 90% 에탄올 추출물이 균주 독성에 대한 가능성을 시험하기 위하여 추출물만을 첨가하여 spot test를 한 결과(자료 제시되지 않았음) 균주 독성에 대한 징후가 없었다. 또한 Maron과 Ames(1983)는 음성 plate의 background lawn에 비하여 시험 plate에 비하여 lawn이 얇은 것은 균주 독성의 증거라 하였는데, 이러한 징후를 보이지 않았다.

미역과 다시마 추출물의 항균효과

미역과 다시마의 에탄올 추출물이 식품의 발효나 부패에 관여하는 미생물에 대한 영향을 검토하기 위해 식품 독소 생성에 관여하는 그람양성세균인 *B. subtilis*, 인체 장내 상주균으로서 nitrosamine 형성에 관여하는 그람음성세균인 *E. coli* 및 진핵생물로서 발효에 관여하는 효모인 *S. cerevisiae*를 사용하여 항균성을 검토한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Percent growth inhibition of ethanol extracts of dried sea-mustard and sea-tangle on microbes

Ethanol conc. (%)	Percent inhibition (%)						Soluble solid per tube (mg) ¹	
	<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>			
	M ²	T ²	M	T	M	T	M	T
10	40	23	0	3	54	8	73.4	42.5
30	27	24	1	9	35	13	92.7	154.0
50	25	27	2	0	71	27	97.9	113.8
70	41	93	11	96	44	8	68.2	103.0
90	39	76	17	88	52	74	23.4	23.4

¹ 1.5ml of each extract per tube was added.

² M : Sea-mustard, T : Sea-tangle.

미역의 에탄올 추출물은 전반적으로 *S. cerevisiae*에 대하여 보다 높은 생육저지 효과를 보였고, 다음으로 *B. subtilis*, *E. coli* 순서이었다. 그러나 에탄올 농도에 따른 추출물의 항균성은 뚜렷한 경향을 보이지 않았다. 반면 10~50% 다시마의 에탄올 추출물은 *B. subtilis*에 대하여 보다 높은 항균성을 보였으며, 특히 70과 90% 에탄올 추출물은 *B. subtilis*, *E. coli*에 대하여 높은 생육저지효과

를 보였다. 따라서 미역 추출물은 세균보다는 효모에 대하여 높은 항균효과를 보이고 있어서, 침체류 숙성 중에 발생하는 효모들에 의한 연부현상이나 부패방지 (Ha, 1960; 한 등, 1990)에 유익한 것으로 보여지며, 다시마의 70과 90% 에탄올 추출물은 세균에 대하여 높은 생육저지효과를 나타내고 있어서 항세균성 물질로 유용하게 이용될 것으로 기대되는 바 이에 대하여 앞으로 더 많은 연구·검토가 필요하리라 생각된다.

요 약

미역과 다시마의 에탄올 농도별 추출물의 NDMA에 대한 항돌연변이 효과 및 *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*에 대한 항균효과를 검색하였다. 다시마 에탄올 추출물의 항돌연변이 효과는 전반적으로 미역 추출물보다 높았다. 다시마의 70과 90% 에탄올 추출물은 TA100과 TA102에서 NDMA에 대하여 높은 항돌연변이 활성을 나타내었으며, 특히 TA100에서 97% 이상의 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. 항균효과로서 미역의 50% 에탄올 추출물은 *S. cerevisiae*에 대하여 높은 효과를 나타낸 반면, 다시마의 70과 90% 에탄올 추출물은 *B. subtilis*와 *E. coli*에 대하여 높은 항균활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 기초연구지원 (과제번호 901-044-2)에 의하여 수행한 연구결과의 일부로 이에 깊은 감사드립니다.

참 고 문 헌

Ariyoshi, T., J. Kai, S. Mitarai, T. Nakashima and M. Washizaki. 1982. Effect of acute treatment with dimethylnitrosamine on the contents of cytochromes and on the activities of γ -aminolevulinic acid synthetase, heme oxygenase and drug-metabolizing enzymes in the liver of rats. Food Hyg. Soc. Japan., 23 (5), 377~383.

Guttentplan, J.B. 1984. Effect of pH and structure on the mutagenic activity of N-nitroso compounds. In 'Genotoxicology of N-Nitroso Compounds, Rao, T.K., W. Lijinsky and J.L. Epler, Eds., Plenum Press, New York and London, Vol 1, pp. 59~90.

Guttentplan, J.B. and Y.C. Hu. 1984. Mutagenesis by N-nitroso compounds in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104: Evidence premutagenic adenine or thymine DNA adducts. Mutation Res., 141, 153~159.

- Ha, Soo-sup, 1960. Studies on the effects of polygalacturonase and film-forming microbes on the soft-deterioration of the pickled vegetables. *과연취보*, 5 (2), 139~147. (in korea)
- Kim, S.H., J.S Wishinok. and S.R. Tannenbaum. 1985. Formation of *N*-nitrosodimethylamine in Korean seafood sauce. *J. Agric. Food Chem.*, 33 (1), 17~19.
- 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.
- Maron, D.M. and B.N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173~215.
- Nakazawa, S., F. Abe, H. Kuroda, K. Kohno, T. Hiashi and I. Umexaki. 1976. Antitumor effect of water-extracts from marine algae (1). *Chemotherapy*, 22, 1435~1442.
- Negishi, T. and Hayatsu. 1980 The pH-dependent response of *Salmonella typhimurium* TA100 to mutagenic *N*-nitrosamines. *Mutation Res.*, 79, 223~230.
- 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.
- Rositto, G. 1985. Pharmacological and Clinical Study of a New Seaweeds extract registered in the Italian pharmacopeia as Agasol T331. Milano, pp. 15~19.
- Sasaki, T., H. Uchida, N.A. Uchida, N. Takasuka, Y. Tachibana, K. Makiuchi, Y. Endo and H. Kamiya. 1987. Antitumor activity actiimmunodulatory effect of glycoprotein fraction from *Scallop patinopecten yessoensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 (2), 267~272.
- Yahagi, T., M. Magao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada. 1977. Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutation Res.*, 48, 121~130.
- 中澤照三·安部史紀·黒田浩之·河野啓三·東忠英·梅崎男. 1976. 海藻類成分の抗腫瘍作用に 關する研究. 第2報 *Sagassum homeri*について. *Chromatography*, 24, 443~447.
- 西澤一俊. 1984. 海洋バイオマによる燃料油生産に關する調査成果報告書, 第六部品回収システム. 社團法人海洋開發 産業協會, 財團法人 醱酵工業協會, pp. 7~27.
- 한홍의·임종락·박현근·문상식·박영선·주홍택. 1990. 김치부패시 *Brettanomyces custersii* 와 *Klebsiella oxytoea*의 편리공생. *인하대학교 기초과학연구소 논문집*, 11, 171~178.

1997년 6월 2일 접수

1997년 12월 30일 수리