

## 구운 돼지고기 추출물의 돌연변이 유발능과 이에 미치는 마늘의 영향

이철원\*, 홍기형\*, 김영배

국립보건원 식품첨가물과\* 고려대학교 식품공학과

### The mutagenicity of extracts from grilled pork belly and the effect of garlic on it

Chul Won Lee, Ki Hyoung Hong, Young Bae Kim

*Div. of food additive. National Institute of Health*

*Div. of food science & Technology. Korea University.*

#### Abstract

This study was carried out to examine the mutagenicity of extracts from grilled pork belly and the effect of garlic on it by using Ames test. And in order to imitate the in vivo metabolic activation system of the mutagens, the enzymatic activation system was adopted.

The results are summarized as follows ;

1. The degree of browning in pork belly extracts increased with the increasing heating intensity of the grilling.
2. When pork belly grilled at "low" heating intensity, no mutagenicity was detected. However with the samples grilled at "medium" and "high" heating intensity, mutagenicity was recognized.
3. The mutagenicity of grilled pork belly extract decreased remarkably with the addition of S-9 mix.
4. The mutagenicity of grilled pork belly extract decreased with the addition of garlic extract.

## I. 서 론

인간의 환경조건은 암발생 원인에 있어서 매우 중요한 인자<sup>1-4)</sup>이며, 환경조건중에서도 식품의 섭취에 의한 영향이 크다. Wynder와 Gori<sup>2)</sup>는 전체 암발생의 80~85%가 환경적인 요인에서 시작된다고 보고 이러한 암발생의 원인의 40~60%가 식이와 관계가 있다고 하였다.

이러한 식품중의 발암물질 및 돌연변이 유발성 물질의 존재여부를 예견하는 방법으로 Ames 법<sup>5-9)</sup>이 편이성 때문에 널리 쓰인다.

“Ames test”는 Histidine 요구성인 *Salmonella* LT-2 계통 균주의 역돌연변이 빈도를 비교하여 검사시료의 돌연변이 유발성을 검정하는 short-term test<sup>9)</sup>의 일종으로서 장시간에 걸쳐 행하는 실험에 비해 적은 인력으로 매우 빠른 시간에 경제적으로 실험을 수행할 수 있을 뿐만 아니라 검출된 돌연변이 유발성 물질의 작용기간을 밝힐 수 있다는 장점이 있다.

또한 이 방법은 발암성 물질과 돌연변이 유발성 물질의 상관관계를 밝히는 데도 사용되나 정량적인 위해도(危害度)를 정확히 파악할 수 없다는 문제점을 안고 있다.<sup>20)</sup>

발암성 예측에 있어 Ames test의 효율성은 그 자체로는 돌연변이 유발성을 갖고 있지 않으나 고등동물의 대사과정에 의해 돌연변이 유발물질로 전환될 수 있는 시료에 대해 Mammalian microsomal enzyme system을 도입함으로써 크게 높아졌는데, 발암성 물질의 약 80~90%<sup>5),9),10)</sup>는 Ames test에서 돌연변이 유발물질로 작용하는 것으로 알려졌다.

Ames 법을 이용하여 식품중의 돌연변이 유발성 물질의 존재와 그 변이능을 조사한 결과들이 발표되었고, 특히 육류식품의 가열조리 과정에서도 돌연변이 유발성 물질을 형성한다는 것이 보고된 바 있다.<sup>11-19)</sup> 국내에서도 이(李)<sup>20)</sup>는 *Salmonella*/Mammalian-Microsome 실험법에 의한 육류식품 열분해 산물에서 heterocyclic amine 류가 돌연변이 유발성 물질로 보고되었다. 또한 한약재<sup>21)</sup> 및 고사리<sup>22)</sup>와 과일과 야채의 잔류농약<sup>23)</sup>에 대한 돌연변이 유발능에 대해서도 각각 연구보고가 있다.

돌연변이 유발능과 그 억제 효과에 대한 연구로는 아스코르빈산<sup>24)</sup>, chlorophyll<sup>25)</sup>, antioxidant<sup>26)</sup> 및 소금<sup>27)</sup>에 대한 것이 있다.

최근에는 조리온도<sup>28,29)</sup>, 조리방법<sup>29)</sup>, 조리기구<sup>30)</sup> 등의 인자가 돌연변이 유발능에 미치는 영향이라든지 돌연변이 유발능의 증가 또는 감소 요인들에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.

마늘은 백합과에 속하는 식물로서 마늘에 함유되어 있는 유황합유성분인 allicin에는 항균, 항종양 및 항곰팡이 등의 여러가지 작용이 알려져 있다. Edward<sup>31)</sup>와 조<sup>32)</sup> 등이 마늘에 의한 세균억제작용을 발표하였고, 또한 황<sup>33)</sup>에 의하면 마늘이 항암성이 있음을 보고하였으며, Bersani<sup>34)</sup> 등은 Ames test에 의해 마늘 성분에는 돌연변이 유발능이 없다고 보고하였다.

우리나라의 식습관은 육류조리나 섭취시 마늘을 병용하는 경우가 많다. 본 연구는 이점에 착안하여 육류조리시 생성되는 돌연변이 유발능과 마늘이 돌연변이 유발능에 미치는 효과를 밝히고자 시도되었다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 시약 및 시료

L-Histidine · HCl, D-Biotin, Glucose-6-phosphate, NADP, N-Nitroguinoline-N-Oxide, 2-Aminofluorene 및 Sodium azide는 Sigma Chem. Co.에서, Arochlor 1254는 Analabs Inc.에서, Nutrient broth No.2는 Oxoid Ltd.에서 각각 구입하였으며, 기타 일반시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

실험에 사용된 돼지고기는 삼겹살부위로 서 냉동한 것을 시중에서 구입하였다. 시료의 크기는 5 cm×4 cm×2 mm 정도로 얇게 자른 것을 실험에 사용하였다. 마늘은 껍질을 벗겨 포장되어 있는 중간크기의 것을 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 시료 추출법

#### 1) 구운 삼겹살 추출물

다이알에 1, 2, 3으로 표시되어 있는 가정용 가스렌지(Rinnai 260)를 사용하여 삼겹살을 각 단계에서 앞뒤를 골고루하여 4분간 가열하였다. 다이알 1에서 가열한 것을 약(low), 2와 3을 각각 중(middle)과 강(high)으로 표시하였으며, 중(middle)단계가 일상적으로 먹기에 적절한 수준이었다.

각단계에 따라 구운 삼겹살을 냉동건조시켜 유발에서 같은 후 Overvik<sup>7),16)</sup> 등의 실험법에 의해 추출하였다.

건조시료 1g 당 5ml의 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH(1 : 1, V/V)을 넣고 계속 저어주면서 하룻밤 추출한 다음 석면 유리깔대기를 사용하여 감압여과하였다. 같은 방법으로 추출을 두번 반복하여 행한 후 여기서 얻은 추출액을 4°C

냉장고에 하룻밤 정치하여 형성된 침전물을 다시 감압 여과하여 감압농축기에서 농축하였으며, 농축시 용매가 거의 증발되면 질소 가스를 천천히 불어넣어 남은 용매를 제거하였다. 이때 농축온도는 50°C를 넘지 않도록 하였다. 농축 건조된 추출물을 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)에 녹여 "Extract I"으로 사용하였다.

"Extract II" 및 "Extract III"는 추출용매로서 각각 CH<sub>3</sub>OH 및 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 (in C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 4 : 1)을 사용하여 "Extract I"과 같은 방법으로 준비하였다.

추출과정은 Fig. 1에 보였다.

모든 추출물은 감압 농축기로 농축시키기 전에 갈색도를 측정하기 위하여 Spectrophotometer를 사용하여 430 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) 마늘 추출액의 제조

마늘 125g을 증류수를 넣고 homogenizer로 마쇄한 후 각각 실온 혹은 100°C에서 3시간 추출하고 여과지로 여과한 후 증류수로서 각각의 총용량을 500 ml로 하였다.

상온 추출액은 milipore filter(0.45µm)로 여과하고, 100°C 추출액은 121°C에서 30분간 가압살균하여 실험에 이용하였다.

### 3. Ames test

#### 1) 실험균주

Salmonella typhimurium TA 98과 TA 100의 두 균주를 고려대학교 농화학과에서 분양받아 실험에 사용하였다.

TA 98은 frameshift 돌연변이체인 his D 3052 돌연변이 균주로, 돌연변이 유발원에 대한 감수성을 높이기 위해 막의 구성성분

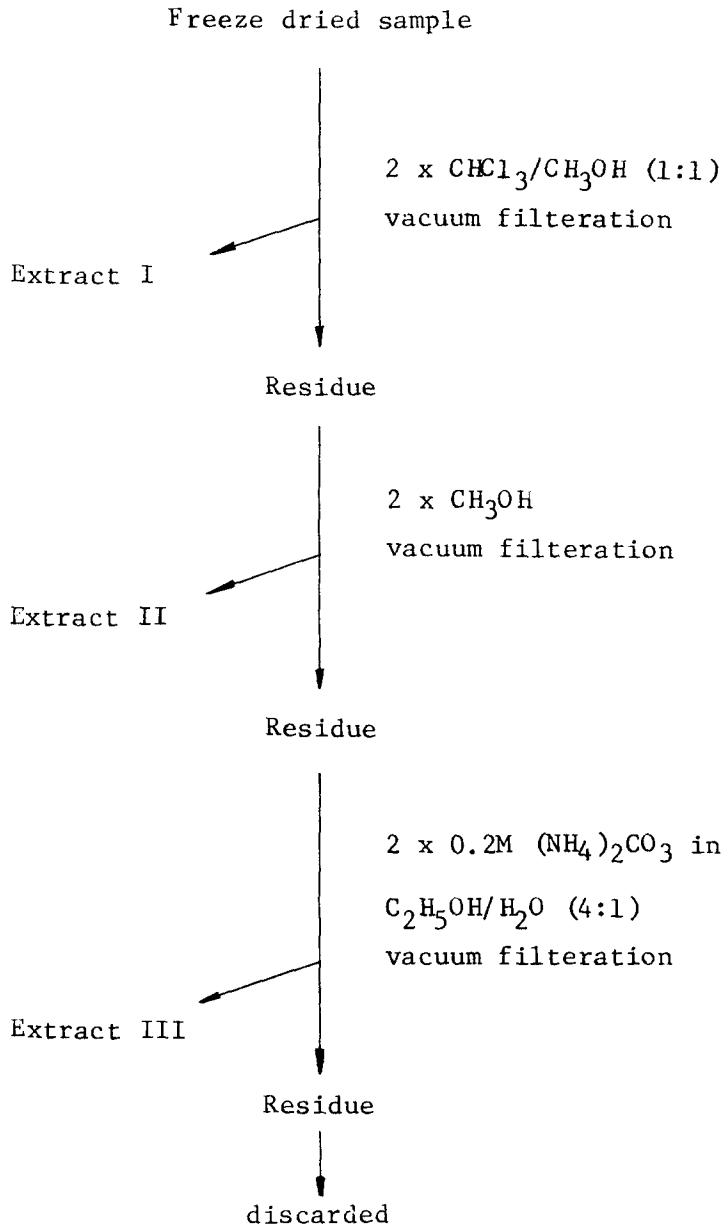


Fig. 1 Schematic procedure for preparation of extracts from grilled pork belly.

인 lipopoly saccharide 가 결여된 rfa 돌연변이와 DNA excision repair system 에 관여하는 유전인자가 결여된 uvrB 돌연변이 및 R-factor plasmid 의 일종인 pKM 101 을 도입시킨 균주로서 다양한 frameshift 돌연변이 유

발물질을 검출하는데 많이 이용되는 균주이다. TA 100 은 Histidine 생합성에 관여하여 호소중 첫번째 효소의 유전인자에서 한 Codon 이 바뀐 염기치환 돌연변이체(base substitution mutant)인 his G46 돌연변이 균체

로 TA 98 과 같은 부속돌연변이를 도입시킨 균주로서 여러가지 염기치환 돌연변이를 유발하는 물질을 검출하는데 주로 이용된다.

실험균주의 genotypes 는 Table 1 과 같다.

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

- a. The *rfa* mutations eliminated the polysaccharide side chain of the lipopolysaccharide(LPS) that coats the bacterial surface.
- b. The deletion through *uvrB* also includes the nitrate reductase and biotin genes.
- c. Inclusion of R factor confers resistance to ampicillin.

## 2) 균특성 검사

균주를 사용할 때는 백금이로 ampicillin plate 상에서 잘 자란 부위를 골라 nutrient broth 에 접종한 후 37°C에서 12 시간 이내로 진탕 배양하여 사용하였다. 이들 균주는 본래 성질의 유지를 확인하기 위하여 정기적으로 균특성검사를 실시하였다.

### ① Histidine 요구성 검사

Histidine/biotin 을 첨가한 top agar 2 ml 와 균액 0.1 ml 를 잘 섞어 minimal agar 위에

고루 깔아준 후 plate 를 뒤집어 37°C에서 48 시간 배양하여 성장 유무를 확인하였다. Histidine/biotin 이 첨가되지 않은 top agar 에서는 균이 자라지 못하였다.

### ② Lipopolysaccharide 제거 확인(*rfa*)

이 확인실험은 세균표피를 둘러싸고 있는 lipopolysaccharide 의 다당류 결사슬이 제거되었는지 확인하기 위하여 crystal violet 에 대한 예민성을 측정하는 실험이다. Nutrient agar 위에 top agar 2 ml 와 균액 0.1 ml 를 잘 섞어 고루 깔아준 후 살균된 직경 6 mm 의 여과지 원반을 중앙에 놓고 crystal violet 1 mg/ml 인 용액 10 $\mu$ l 를 여과지 원반위에 흡착시켜 37°C에서 12 시간동안 plate 를 뒤집어 배양한 후 여과지 원반주위의 투명한 크기를 재어 직경 14 mm 이상인 colony 만을 선택하였다.

### ③ *uvrB* Mutatin

Nutrient agar 위에 각 균주의 현탁액을 streak 한 후 plate 의 1/2 을 aluminun foil 로 차단하고 자외선을 6 초동안 조사한 후 배양하였다. 정상균주는 repair gene 이 있으므로 uv 조사에 피폭되더라도 다시 살아나지

Table 1. Genotype of the TA strains used for mutagenesis testing

		Histidine mutation	Additional mutation		Induced R-factor
			LPS <sup>a</sup>	Repair <sup>b</sup>	PKM 101 <sup>c</sup>
TA 98	his D 3052	<i>rfa</i>	UVrB	+ R	
TA 100	his G 46	<i>rfa</i>	UVrB	+ R	

만, 본 균주들은 조사받은 부위에서 성장하지 못한다.

#### ④ R-factor (pKM 101)

1 ml의 0.02 N NaOH에 8 mg의 ampicillin을 녹인 용액 10  $\mu$ l를 nutrient agar plate 중앙에 streak 한 후 건조시키고 각 균주의 현탁액을 직각이 되게 streak 한 후 plate를 뒤집어 37°C에서 20 시간 배양하였다. Ampicillin에 저항성을 보이는 균은 저해없이 잘 자라나 감수성이 큰 균은 성장저해지역이 나타났다.

#### ⑤ Spontaneous reversion

균현탁액 0.1 ml와 top agar 2 ml를 잘 섞어 minimal agar 위에 균일하게 퍼주었다. 자연발생적 역돌연변이의 빈도가 비정상적으로 많은 균주는 실험에 사용하지 않았다. 일반적으로 표준적인 실험조건에서 TA 98은 15~30, TA 100은 100~150개의 자연발생적 역돌연변이 colony를 나타내었다.

#### 4. S-9 mix 조제

Arochlor 1254를 corn oil 1 ml당 200 mg의 농도로 녹여, 체중 kg당 500 mg이 되도록 Sprague-dawley 흰쥐의 수컷에 복강주사하여 5일후 희생시켰다. 간 채취시 모든 단계는 0~4°C에서 행하였고, 용매와 기구는 멸균된 것을 사용하여 무균적으로 하였다. 생간 1g당 0.15 M KCl 1 ml의 용액을 넣어 미리 칭량해둔 비이커에 갖 채취한 간을 넣어 무게를 잰 다음 찬 KCl 용액으로 충분히 씻었다. 씻은 간은 간무게의 3배(3 ml/g wet liver)가 되는 0.15 M KCl을 담은 비이커에 넣고 멸균된 가위로 잘게 자른다. 다음 homogenizer로 마쇄시킨다. 이 마쇄물을 9,000 g에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을

따루어 보관한다. 이때 얼음위에 1~2 ml 용량의 멸균된 vial을 놓고 위에서 만든 S-9 fraction을 나누어 넣은 후 즉시 deep freezer에 넣어 보관하였다.

S-9 mixture의 조성은 Table 2와 같다.

#### 5. 미생물 배지의 조제

##### 1) Vogel-Bonner minimal agar plate

증류수 930 ml에 Agar 15 g을 섞어 가압살균하여 약간 식힌후 40% Glucose 50 ml와 50×VB salts 용액 20 ml를 거품이 나지 않게 고루 잘 섞은다음 살균된 petridish plate 당 30 ml 정도씩 부어 굳혔다.

##### 2) 50×VB salts

Table 4와 같은 여러가지 염을 순서대로 따뜻한 증류수에 완전히 녹인 후 20 ml씩 100 ml 삼각플라스크에 부어 솜마개를 하고 가압살균하여 실온으로 식힌뒤 상온 보관하였다.

##### 3) Top agar

Agar 6 g, NaCl 5 g을 증류수 1l에 녹여 가압살균하여 상온에 보존하였으며, Mutagenicity assay시 top agar 100 ml에 10 ml의 histidine/biotin 액을 첨가하여 이용하였다.

\* 0.5 mM histidine/biotin solution : 증류수 250 ml에 D-Biotin 30.9 mg, L-Histidine HCl 24.0 mg을 잘 섞어 가압살균후 4°C에 보관하여 사용하였다.

##### 4) Nutrient agar plate

Difco bacto nutrient broth 8g과 NaCl 5g을 증류수 1l에 잘 섞어 녹여 가압살균후 식혀서 plate를 만들었다.

##### 5) Nutrient broth

Oxoid nutrient broth No. 2 2.5g을 증류수 100 ml에 잘 녹인후 20 ml씩 100 ml 삼각플

Table 2. Composition of the S9 mixture

Rat liver S9 Fraction	2.0 ml ( 4 % )
MgCl <sub>2</sub> -KCl salts	1.0 ml
1M Glucose-6-phosphate	0.25 ml
0.1M NADP	2.0 ml
0.2M phosphate buffer, PH 7.4	25.0 ml
Sterile distilled H <sub>2</sub> O	19.75 ml

S9 mixture 50.0 ml

\* MgCl<sub>2</sub>-KCl salts solution

KCl 61.5 g

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 40.7 g

Distilled water 500 ml

\* 0.2M Phosphate buffer, PH 7.4

0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (13.8 g/500 ml) 60 ml

0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (14.2 g/500 ml) 440 ml

Table 3. 50×VB salts

Distilled water ( about 45 °c )	670 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 g
Citric acid monohydrate	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	175 g

Table 4. Mutagenicity of Garlic extract on Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100.

Extration temperature	Strains	No. of Revertant colonies/plate				
		mg of garlic/plate				
		0	5	12.5	20	25
room Tem.	TA 98	22±1 <sup>a</sup>	36±4	42±3	48±4	37±5
	TA 100	106±10	113±2	127±1	136±3	125±1
100 °C	TA 98	22±1	34±6	53±2	35±1	32±3
	TA 100	106±10	22±3	125±2	120±7	118±4

라스크에 넣은뒤 가압살균하였다.

#### 6. 돌연변이 유발성 시험

시료의 돌연변이 유발능 검사는 Ames의 방법에 따라 plate incorporation test를 다음과 같이 행하였다.

DMSO(Dimethyl Sulfoxide)에 녹인 시료 0.1 ml와 배양한 실험균주 0.1 ml 그리고 0.5 ml의 S-9 mix(+S9) 또는 0.5 ml의 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4, ~S9)을 멸균된 뚜껑있는 시험관에 넣은다음 잘 섞는다. 여기에 45°C로 올린 top agar(0.5 mM histidine/biotin 용액을 100 ml 당 10 ml 첨가) 2 ml를 넣고 신속히 섞어준 다음 minimal glucose agar plate에 붓는다. 이때 top agar가 plate 표면에 골고루 퍼질 수 있도록 plate를 재빨리 기울이며 돌려준 다음 평평한 곳에 놓아 두어 agar가 굳도록 한다. 그 다음 plate를 뒤집어 37°C 배양기에서 48시간 배양한 후 revertant colonies를 센다. 모든 실험은 전과정을 3반복하였으며 평균치±표준편차를 구하였다.

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 구운온도에 따른 삼겹살 추출물의 흡광도(갈색도)변화

가열한 삼겹살의 갈색화 정도를 비교하기 위하여 Spectrophotometer를 사용하여 430 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fig. 2와 같이 3추출물은 모두 가열온도가 상승함에 따라 흡광도가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 가열온도가 높을수록 고기표면이 갈색화 되는 정도가 크다. 이러한 물질은 Extract I에 가장 많이 용출되었음을 알 수 있었다.

#### 2. Positive control에 의한 Ames test의 검증

돌연변이 유발물질(발암물질)로 널리 알려져 있는 Sodium azide, 2-Aminofluorene 및 4-Nitroquinoline-N-Oxide 등이 본 실험에서 사용하려는 Salmonella typhimurium TA 98, TA 100에 대해 역돌연변이 유발 가능성이 있고, 미량의 histidine을 첨가한 배지에서



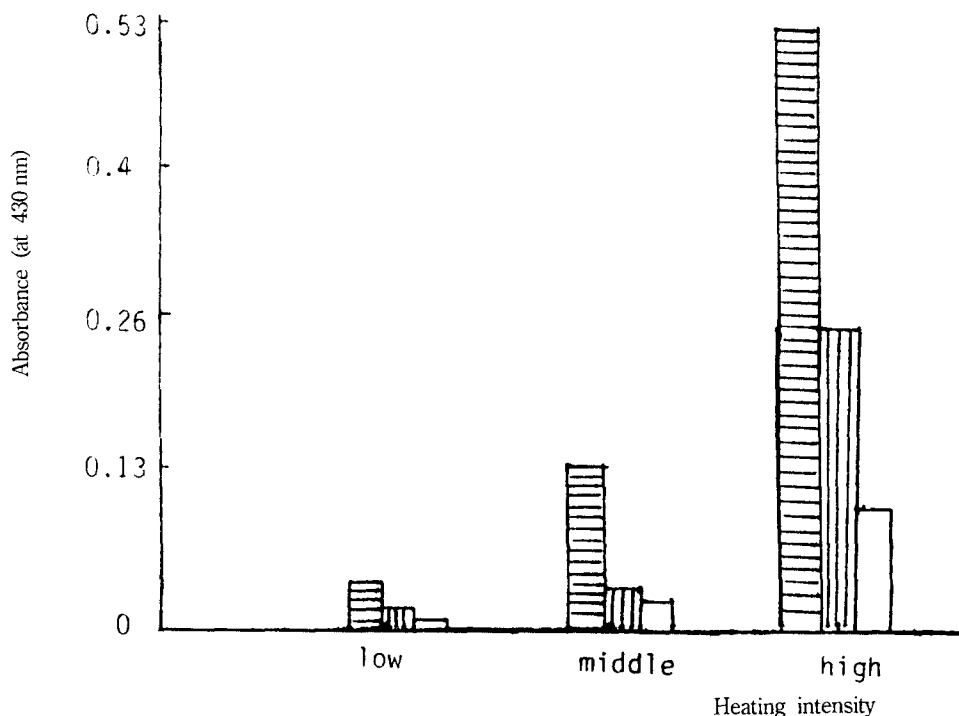


Fig. 2 Effect of heating intensity of grilling on brown color formation.

- ▨ Extract I (Extract in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH)  
 ▩ Extract II (Extract in CH<sub>3</sub>OH)  
 □ Extract III (Extract in 0.2M NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

돌연변이 유발능을 분석하는 Ames test 가 정상적으로 작동하는지를 알아보기 위하여 이들 돌연변이 유발물질의 농도를 달리하여 사용하려는 개개 Salmonella typhimurium 균주의 반응을 조사하였다.

S-9 mix 를 첨가시켰을 경우에만 돌연변이 유발능력을 보이는 약품으로서 2-Aminofluorene 은 Fig. 3 에서와 같이 TA 98, TA 100 두 균주 모두 0.7 µg/plate 까지는 역돌연변이 수가 비례적으로 증가하였으나 그 이후는 감소하는 경향을 나타내었다. S-9 mix 를 첨가하지 않았을 때의 돌연변이 유발능력을 보이는 약품으로서 4-Nitroquinoline-N-Oxide 는 Fig. 4 에서와 같이 TA 98 에 대해 농도에

따라 역돌연변이 수가 비례적으로 증가하여 돌연변이 유발을 확인할 수 있었고, Sodium azide 는 TA 100 에 대해 Fig. 5 에서와 같이 4 µg/plate 까지는 역돌연변이 수가 비례적으로 증가하였다가 그 이후에는 감소하는 경향을 보였다.

위의 실험결과를 토대로 본 실험에서 S-9 mix 를 첨가하여 검정할 때는 2-Aminofluorene 0.5 µg/plate 를 S-9 mix 를 첨가하지 않고 TA 98 을 사용할 때는 4-Nitroquinoline-N-Oxide 0.4 µg/plate 를, TA 100 을 사용할 때에는 Sodium azide 3 µg/plate 를 각 histidine reversion 검정 때마다 positive control 로서 시료추출물과 함께 병행사용하여 돌연변이

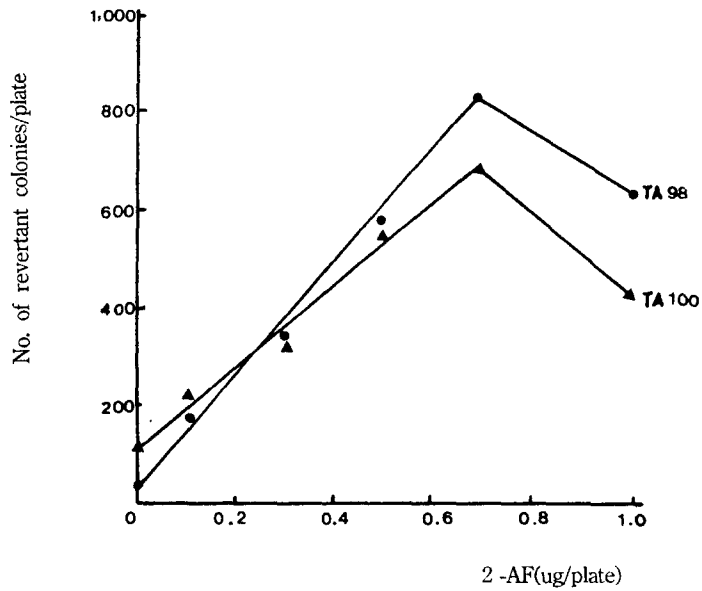


Fig. 3 Dose-response curve of mutagenicity of 2-Aminofluorene (2-AF) in the presence of S-9 mix on Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100.

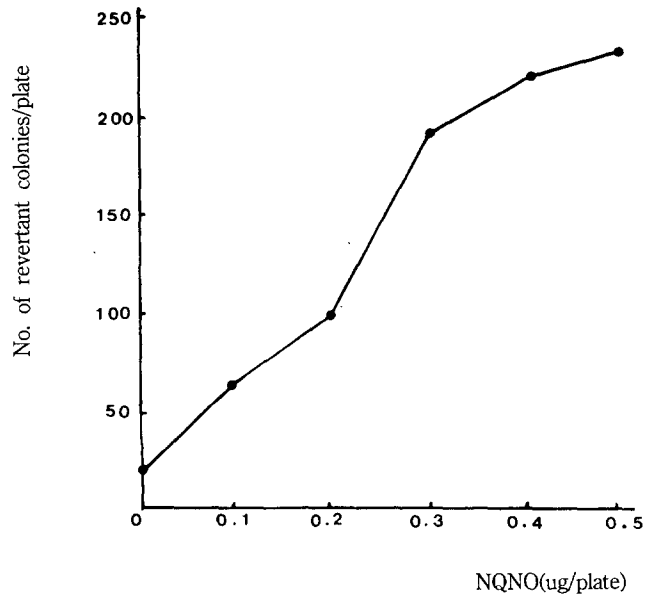


Fig. 4 Dose-response curve of mutagenicity of 4-Nitroquinoline-N-Oxide (NQNO) without S-9 mix on Salmonella typhimurium TA 98.

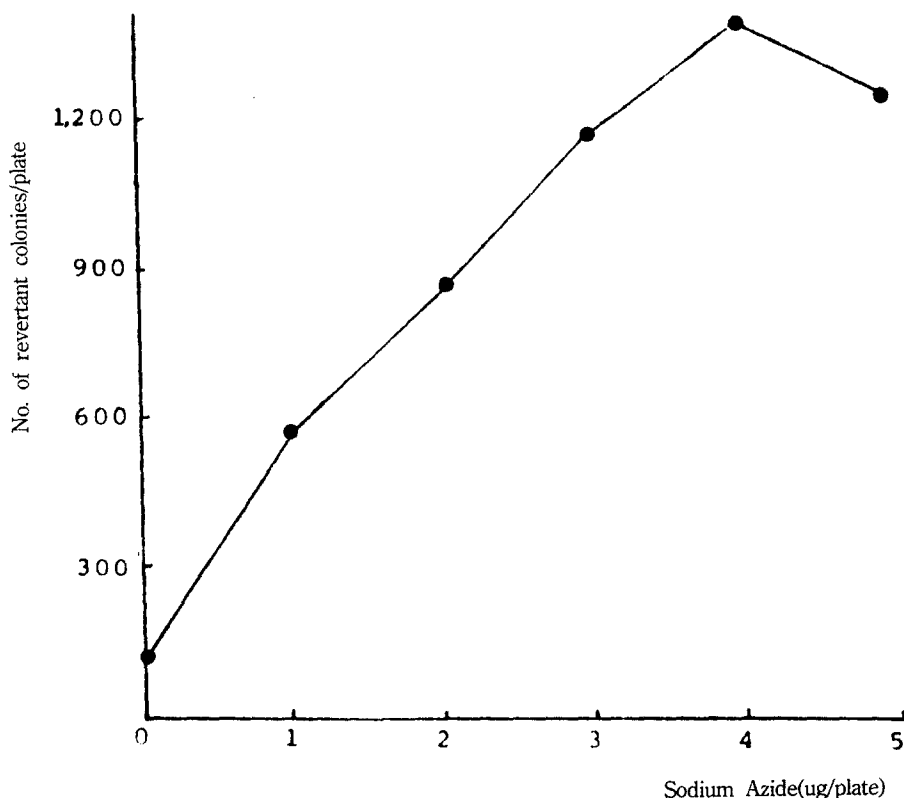


Fig. 5 Dose-response curve of mutagenicity of Sodium Azide on *Salmonella typhimurium* TA 100 without S-9 mix.

유발을 확인하였다.

### 3. 마늘추출액의 Ames test

마늘의 allicin 성분에 의한 세균억제력과 마늘 자체의 돌연변이 유발능을 살펴보기 위하여 Ames test를 행한 결과 Table 7과 같이 나타났다. Bersani<sup>30)</sup> 등이 Ames test에 의해 마늘 성분에는 돌연변이 유발능이 없다고 보고하였으나 본 실험결과에서는 실온 추출액과 100°C 추출액이 별차이없이 TA 98에서 1.6~2.4 배정도 증가한 것으로 나타났다. 한편 TA 100에서는 1.1~1.3 배정도로 역 돌연변이빈도가 control에 비하여 거의 차이

가 없었다.

a. Values represent means  $\pm$  standard deviation

### 4. 구운 삼겹살 추출물의 돌연변이 유발능

가스렌지의 화력의 강도를 달리하여 준비한 삼겹살시료의 추출물(Extract I, Extract II, Extract III)로 Ames test을 행한 결과는 Table 8과 같다.

Sample 추출에 있어서  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1)에 의한 경우는 fat-soluble fraction, 즉 glycerides, phospholipids와 가열에 의해 형성

Table 5. Mutagenicity of extracts from 'gas grilled pork belly' by Salmonella typhimurium TA 98.

Heating intensity	Extracts <sup>a</sup>	S-9 <sup>b</sup>	No. of Revertant colonies/plate				
			mg of grilled pork belly/plate				
			0	100	250	400	500
Low	I	+	35 ± 7 <sup>C</sup>	33 ± 5	73 ± 4	38 ± 4	80 ± 7
		-	22 ± 1	38 ± 7	36 ± 8	40 ± 2	54 ± 3
	II	+	35 ± 7	34 ± 10	48 ± 1	60 ± 7	40 ± 2
		-	22 ± 1	28 ± 2	44 ± 3	24 ± 1	27 ± 6
	III	+	35 ± 7	30 ± 5	61 ± 4	37 ± 10	37 ± 3
		-	22 ± 1	56 ± 4	44 ± 9	51 ± 13	42 ± 3
Middle	I	+	35 ± 7	61 ± 10	72 ± 7	87 ± 13	115 ± 9
		-	22 ± 1	2132 ± 38	1323 ± 47	1003 ± 15	382 ± 8
	II	+	35 ± 7	76 ± 7	52 ± 3	47 ± 6	37 ± 7
		-	22 ± 1	140 ± 17	45 ± 11	41 ± 8	29 ± 3
	III	+	35 ± 7	59 ± 10	62 ± 8	60 ± 3	38 ± 4
		-	22 ± 1	44 ± 5	68 ± 10	74 ± 3	35 ± 2
High	I	+	35 ± 7	44 ± 1	43 ± 5	92 ± 3	135 ± 13
		-	22 ± 1	1052 ± 31	993 ± 18	1123 ± 14	874 ± 16
	II	+	35 ± 7	65 ± 8	42 ± 11	40 ± 3	39 ± 6
		-	22 ± 1	1073 ± 13	1404 ± 21	1523 ± 10	754 ± 11
	III	+	35 ± 7	76 ± 2	51 ± 4	38 ± 9	40 ± 3
		-	22 ± 1	893 ± 15	952 ± 20	25 ± 3	27 ± 1

a : Extracted by ; CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH(I), CH<sub>3</sub>OH(II), 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(III)

b : + ; Tested in the presence of S9 mixture

- ; Tested in the absence of S9 mixture

C : Values represent means ± Standard deviation

된 heterocyclic amines 등이 추출될 수 있다. CH<sub>3</sub>OH 추출에 의한 경우는 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 용매에 추출되지 못하고 남은 phospholipids

와 좀더 극성을 띤 물질들이 추출되며, 또한 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용매에 의한 경우는 Basic fraction의 효과, 즉 nitrosamine을 포함한 basic

Table 6. Mutagenicity of extracts from 'gas gilled pork belly' by *Salmonella typhimurium* TA 100.

Heating intensity	Extracts <sup>a</sup>	S-9 <sup>b</sup>	No. of Revertant colonies/plate				
			mg of grilled pork belly/plate				
			0	100	250	400	500
Low	I	-	120 ± 11 <sup>c</sup>	125 ± 7	127 ± 9	119 ± 6	200 ± 3
		-	106 ± 10	145 ± 3	147 ± 1	127 ± 2	104 ± 11
	II	+	120 ± 11	118 ± 8	150 ± 2	123 ± 4	125 ± 7
		-	106 ± 10	138 ± 2	142 ± 3	176 ± 1	138 ± 4
	III	+	120 ± 11	134 ± 3	128 ± 2	115 ± 5	118 ± 3
		-	106 ± 10	133 ± 2	132 ± 4	194 ± 3	176 ± 10
Middle	I	+	120 ± 11	150 ± 20	120 ± 9	116 ± 14	124 ± 16
		-	106 ± 10	1510 ± 23	1623 ± 31	215 ± 17	414 ± 15
	II	+	120 ± 11	190 ± 6	134 ± 7	130 ± 9	110 ± 11
		-	106 ± 10	341 ± 3	204 ± 21	153 ± 7	131 ± 10
	III	+	120 ± 11	158 ± 3	137 ± 7	116 ± 20	129 ± 31
		-	106 ± 10	294 ± 15	483 ± 21	180 ± 10	159 ± 13
High	I	+	120 ± 11	437 ± 17	155 ± 8	333 ± 15	104 ± 13
		-	106 ± 10	1210 ± 31	1319 ± 43	1211 ± 25	1098 ± 19
	II	+	120 ± 11	104 ± 15	171 ± 1	121 ± 9	119 ± 6
		-	106 ± 10	1091 ± 3	919 ± 18	644 ± 21	529 ± 10
	III	+	120 ± 11	136 ± 3	113 ± 13	121 ± 17	130 ± 8
		-	106 ± 10	118 ± 2	135 ± 11	125 ± 12	146 ± 21

a : Extracted by ; CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH ( I ), CH<sub>3</sub>OH(II), 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(III)

b : + ; Tested in the presence of S9 mixture

- ; Tested in the absence of S9 mixture

c : Values represent means ± Standard deviation

물질들의 추출정도를 알아보고자 한 것이다.<sup>20)</sup>

낮은 온도에서 구운시료에서는 뚜렷한 돌연변이 유발능은 확인되지 않았으나 CHCl<sub>3</sub>

/CH<sub>3</sub>OH 로 추출한 시료에 S-9 mix 를 첨가한 경우 TA 98 에서는 최고 2.2 배정도, TA 100 에서는 최고 1.6 배정도의 역돌연변이 빈도

**Table 7.** Effect the addition of Garlic extract (25 mg equivalent/plate) on mutagenicity of grilled pork belly extract (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH) by Salmonella typhimurium TA 98

Heating intensity	S-9 mix <sup>a</sup>	No. of Revertant colonies/plate				
		mg of grilled pork belly/plate				
		0	100	250	400	500
Middle	+	40 ± 3 <sup>b</sup>	65 ± 11	87 ± 9	80 ± 13	77 ± 10
	-	31 ± 2	60 ± 10	55 ± 7	101 ± 17	103 ± 21
High	+	40 ± 3	78 ± 13	81 ± 7	65 ± 3	89 ± 12
	-	31 ± 2	140 ± 21	167 ± 18	67 ± 3	64 ± 7

a: + ; Tested in the presence of S9 mixture

- ; Tested in the absence of S9 mixture

b: Values represent means ± Standard deviation

**Table 8.** Effect the addition of Garlic extract (25 mg equivalent/plate) on mutagenicity of grilled pork belly extract (CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH) by Salmonella typhimurium TA 100

Heating intensity	S-9 mix <sup>a</sup>	No. of Revertant colonies/plate				
		mg of grilled pork belly/plate				
		0	100	250	400	500
Middle	+	86 ± 11 <sup>b</sup>	120 ± 3	99 ± 7	80 ± 20	91 ± 18
	-	131 ± 15	181 ± 11	180 ± 13	190 ± 21	185 ± 4
High	+	86 ± 11	120 ± 7	109 ± 3	117 ± 11	111 ± 8
	-	131 ± 15	191 ± 12	221 ± 14	284 ± 6	201 ± 13

a: + ; Tested in the presence of S9 mixture

- ; Tested in the absence of S9 mixture

b: Values represent means ± Standard deviation

가 증가하였다. S-9 mix 를 첨가하지 않은 경우는 TA 98 에서 최고 2.4 배 정도, TA 100 에서는 최고 1.8 배 정도의 역돌연변이 빈도를 보였다.

중간온도에서 구운 시료에서는 CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH(Extract I) 추출물에서 돌연변이 유발성이 가장 뚜렷하게 나타나서 S-9 mix 를 첨가하지 않은 경우 TA 98 에서는 최고 97 배

정도까지의 역돌연변이 빈도가 증가하였다. 그러나 농도의 증가에 따라서 역돌연변이 빈도는 감소하였으며, 또한 S-9 mix의 첨가로 역돌연변이 빈도는 현저하게 낮아졌다.

높은 온도에서 구운 시료에서는 모든 추출시료에서 현저한 역돌연변이 빈도의 증가를 보였으며, 특히  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  추출물과  $\text{CH}_3\text{OH}$  추출물이 0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  추출물보다 증가정도가 심하였다.  $\text{CH}_3\text{OH}$  용매 추출에 의해서도 높은 돌연변이 유발능을 나타내는 현상은  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  용매에 의해 시료내에 무극성이고 분자량이 적은 물질들이 두 추출용매의 경계부위에 많이 모여 있게 되는데 이러한 물질들이 fat-soluble fraction에는 녹지만 glyceride에 의해 덮여 씌워지기 때문에 'fat-soluble fraction'으로의 용출이 어려워져서 'MtOH fraction'으로 들어갔을 확률이 높다고 추측된다. 그러나 모든 경우 S-9 mix 첨가로 역돌연변이는 현저하게 감소하였다.

TA 98 과 TA 100 두 균주 모두 S-9 mix 첨가에 의하여 돌연변이 유발능이 감소한 것은 구운 돼지고기 추출물에서 직접작용 돌연변이 유발성물질이 주로 생성되었음을 알 수 있다.

##### 5. 구운 삼겹살 추출물에 마늘 추출액 첨가시 돌연변이 유발능실험

전실험결과 높은 돌연변이 유발능을 보인 시료중에서 중간온도 및 높은 온도로 구운 삼겹살을  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  로 추출하여 마늘 추출액 첨가시 돌연변이 유발능에 미치는 영향을 검색한 결과를 Fig. 6, 7에 나타내

었다.

TA 98 에서 S-9 mix 를 첨가하지 않고 마늘 추출액을 첨가한 경우 역돌연변이 빈도는 자연역돌연변이 빈도에 비하여 중간온도에서 구운 추출액에서는 1.8~3.3 배정도, 높은 온도에서 구운 추출액에서는 2.0~5.4 배 정도로 나타났으며 이는 마늘 추출액을 첨가하지 않았을 때보다 각각 9.4~29 배, 9.5~20 배정도 감소한 결과이다.

TA 100 에서 S-9 mix 를 첨가하지 않고 마늘 추출액을 첨가한 경우 역돌연변이 빈도는 자연역돌연변이 빈도에 비하여 중간온도에서 구운 추출액에서는 1.4~1.5 배정도, 높은 온도에서 구운 추출액에서는 1.5~2.2 배 정도로 나타났으며, 이는 마늘 추출액을 첨가하지 않았을 때보다 각각 1.4~10 배, 4.6~8.7 배정도 감소한 결과이다.

따라서 TA 98 과 TA 100 두 균주 모두 마늘 추출액 첨가에 의하여 S-9 mix 를 첨가하지 않은 경우 가열한 삼겹살의 돌연변이 유발능을 1.4 배에서 최고 15 배까지 감소시켰다.

육류의 돌연변이 유발능은 여러가지 인자에 의해 영향을 받는다. 그러므로 육류의 조리과정중 돌연변이 유발능의 생성과정을 종합적으로 이해하려면 육류의 구성성분뿐만 아니라 열원, 조리기구 등의 외적 요인에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것이며, 돌연변이 유발능을 촉진 또는 억제시키는 물질에 대한 연구도 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

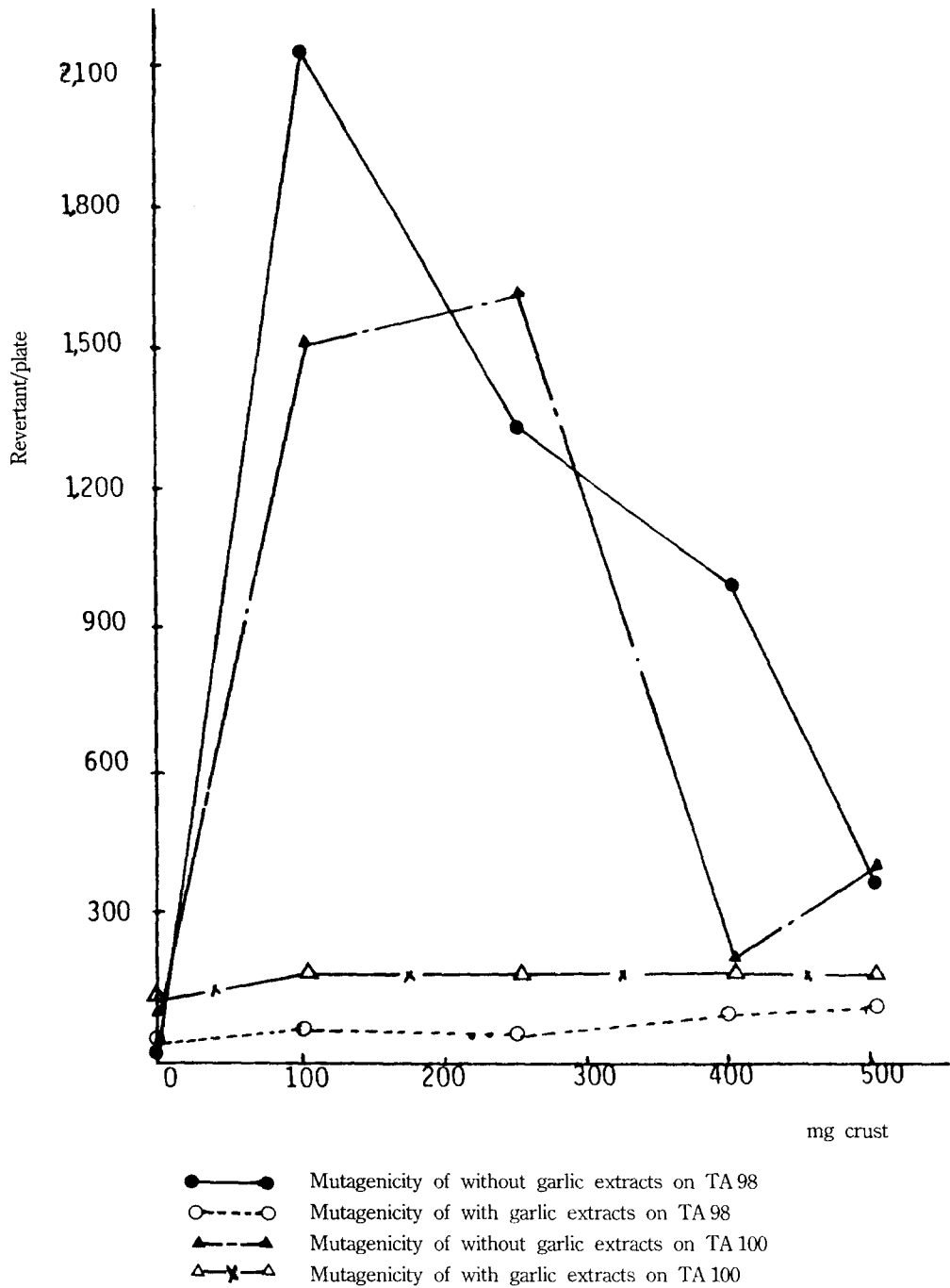


Fig. 6 Mutagenicity of pork belly extract gas-grilled at "middle" step of heating intensity by *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 and the effect of garlic extract on it.



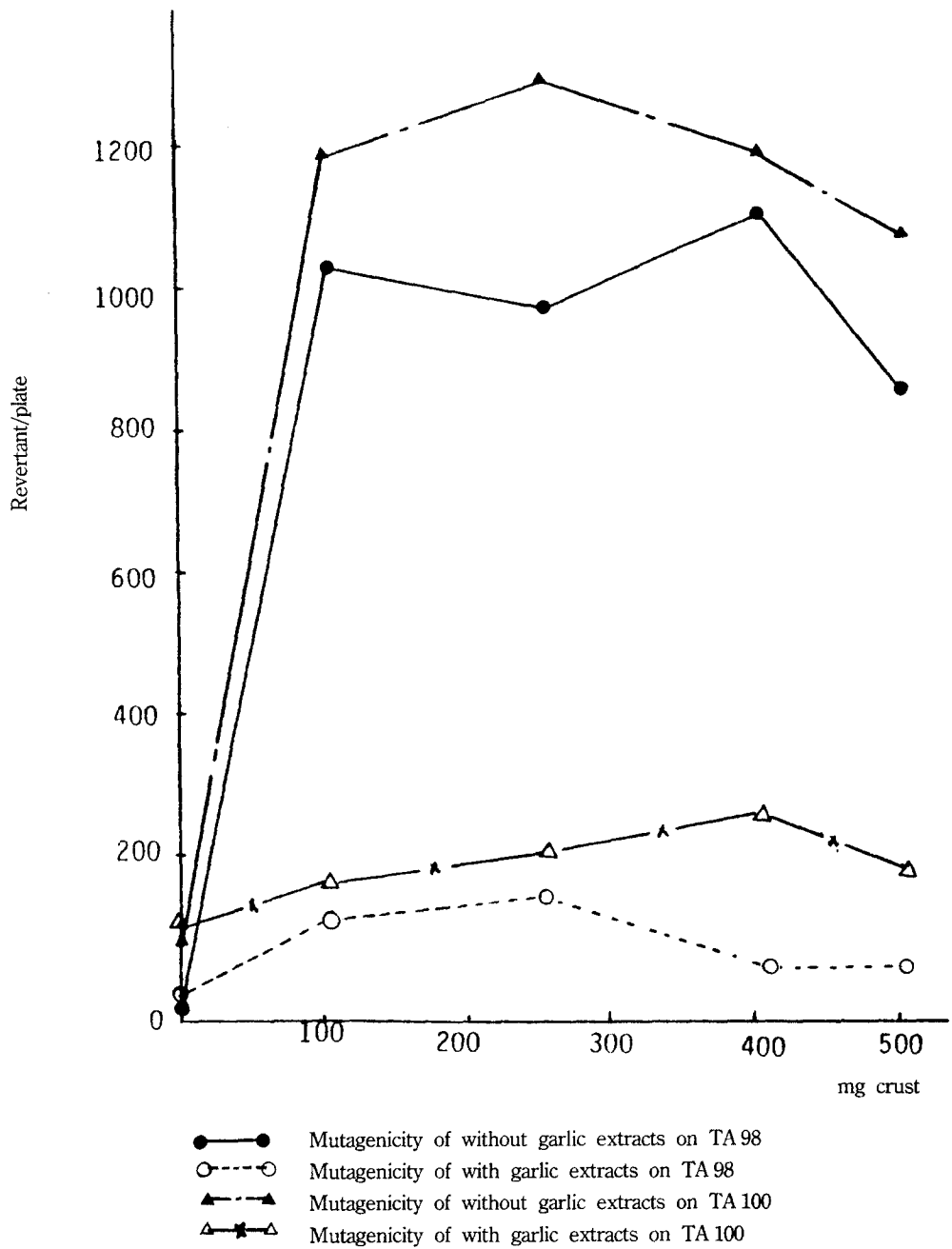


Fig. 7 Mutagenicity of pork belly extract gas-grilled at "high" step of heating intensity by *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 and the effect of garlic extract on it.

## IV. 요약

육류 조리시 생성되는 돌연변이 유발능과 이에 미치는 마늘의 효과를 Ames test 로 살펴본 결과는 다음과 같다.

1. 육류의 가열강도가 높을수록 추출액의 갈색도는 증가하였다.
2. 낮은 강도에서 구운 시료에서는 뚜렷한 돌연변이 유발능은 보이지 않았으나 중간 및 높은 강도로 구운 시료에서는 돌연변이 유발능이 나타났다.
3. S-9 mix 를 첨가한 경우 가열한 고기추출물에 의한 돌연변이 유발능이 현저하게 감소되었다.
4. 가열한 삼겹살 추출물의 돌연변이 유발능은 마늘추출액을 첨가시, 마늘추출액을 첨가하지 않은 경우보다 현저히 감소되었다.

## 참고 문헌

1. Doll R. and Peto R. ; The causes of cancer-Quantitative estimate of avoidable risks of cancer in the United States today, J. Nat. Canc. Instit., 66, 1191, 1981.
2. Wynder E.L. and Gori G.B. ; Contribution of the environment to cancer incidence an epidemiology exercise, J. Nat. Canc. Inst., 58, 825, 1977.
3. Ames B.N. ; Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer science, 294, 11, 1979.
4. Ames B.N., Lee F.D. and Dursion W.E. ; An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogen, Proc. Nat., Acad., Sci., 70, 3, 782~786, 1973.
5. Maron D.M. and Ames B.N. ; Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Research, 113, 173~215, 1983.
6. Ames B.N., McCan J. and Yamasaki E. ; Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian microsome mutagenicity, Mutation Research, 31, 347, 1975.
7. Gerhardt P., Murray R.G.E., Costilow R. N., Nester E.W., Wood W.A., Krieg N.R. and Phillips G.B. ; Manual of Methods for general bacteriology, 236~239, 1981.
8. James G. Cappuccino and Natali Sherman ; Microbiology-A Laboratory manual, 359~361.
9. McCan J., Choi E., Yamasaki E. and Ames B.N. ; Detection of carcinogens and mutagens in the Salmonella/microsome test-Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 5135, 1975.
10. McCan J., Spingram N.E., Korori J. and Ames B.N. ; Detection of carcinogen as mutagens-Bacterial tester stains with R-factor plasmids, Proc. Nat. Acad. Sci., 92, 3, 979~983, 1975.
11. Eva Overvik, Lena Nilsson, Jan-A° ke Gustafsson, Lillemor Fredholm, Osten Levin and Cari-Erik Nord ; High mutagenicity activity fomed in pan-broiled pork, Mutation Research, 135, 149~157, 1984.
12. Lin J.Y., Lee H. and Huang H.I. ; Forma-

- tion of mutagens in broiled pork extract. *Fd. Chem. Toxic*, 20, 531~533, 1982.
13. Bjeldanes L.F., Marris M.M., Timourian H. and Hatch F.T. ; Effect of meat composition and cooking conditions on mutagen formation in fried ground beef, *J. Agric. Food Chem*, 31, 18~21, 1983.
  14. Commoner B., Vithayathi A.J., Dolara P., Nair S., Madyastha P. and Cuca G.C. ; Formation of mutagens in beef and beef-extract during cooking, *Science*, 201, 913~916, 1978.
  15. Pariza M.W., Ashoor S.H., Chu F.S. and Lund D.B.-Effects of temperature and time on mutagen formation in Pan-fried hamberger, *Cancer Lett.*, 7, 63~69, 1979.
  16. Lijinsky W. and Shubik P.-Benzo- $\alpha$ -Pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-Broiled meat, *Science*, 145, 53, 1964.
  17. Larsson B.K., Sahlberg G.P., Eriksson A. T., Busk L.A. ; Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food, *J. Agr and Food Chem.*, 31, 4, 867~873, 1983.
  18. Chae Y.S., Ham S.S., Kang C.G., Guon I. K., Kim G.D. and Cheong G.K. ; Formation of mutagens in cooked chicken, *Korean J. of Animal Science*, 30, 6, 349~356, 1988.
  19. Takashi Sugimura, Minako Nagao ; Mutagenic factors in cooked foods, *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 189~209, 1979.
  20. 이미숙 : Salmonella/Mammalian-Microsome 돌연변이 유발능에 관한 연구, 서울대학교 대학원 박사학위 논문, 1987.
  21. 손성수 : 한국산 한약재의 *Salmonella typhimurium* 과 생쥐 골수세포에서의 돌연변이 유발성, 충남대학교 대학원 석사학위논문, 1988.
  22. 윤재영 : 고사리 돌연변이 유발성 및 Thiamine 분해인자에 관한 연구, 이화여자대학교 대학원 석사학위논문, 1988.
  23. Yong Gu Ko ; Mutagenicity of residual pesticides using to cultivate the fruits and vegetables in the *Salmonella typhimurium*, *Cheju Nat. Univ.*, 1987.
  24. Sang Chul Park, Seung Won Kim and Ki Yung Lee ; A study on mutagenicity of Korean tsate marine foods and mutagenic suppressive activity of ascorbate, *Korean J. Biochem*, 12, 2, 45~57, 1980.
  25. Seung Won Kim, Bun Suk Tchai, Sang Chul Park and Surk Ji Kang-Antimutagenic activity of chlorophyll to direct-and indirect-acting mutagens and its contents in the vegetables, *Korean J. Biochem.*, 14, 1~7, 1982.
  26. Calle L.M. and Sullivan P.D.-Screening of antioxidants and other compound for antimutagenic properties towards benzo [ $\alpha$ ]pyrene-induced mutagenicity in strain TA 98 of *Salmonella typhimurium*, *Mutation Research*, 101, 2, 99-114, 1982.
  27. 박미은 : 육류의 숯불구이시 돌연변이 유발능에 미치는 지방질함량과 소금의 영향, 이화여자대학교 대학원 석사학위 논문, 1988.
  28. Commoner B., Vithayathil A.J., Dolara P., Nair S., Madyastha P. and Cuca ; Scie-

- nce, 201, 913, 1978.
29. Miller A.J. and Buchanan R.L. ; J. Food Sci., 48, 1772, 1983.
  30. Bjeldanes L.F., Morris M.M., Timourian H. and Hatch F.T. ; J.Agric Food Chem., 31, 18, 1983.
  31. Dekaga E.C. and Garagusi V.F. ; Inhibition of mycobacterial by garlic extract (*Allium Sativum*), Antimicrobial Agents and chemother, 27, 4, 485~486, 1985.
  32. 조남철, 전덕영 : 김치에서 분리한 호기성세균의 생육에 대한 마늘의 영향, Korean J. Food Sci. Technol, 20, 3, 357~362, 1988.
  33. 황우익 : 마늘로부터 항암성 성분의 추출 및 그의 항암성 활성측정에 관한 연구, 한국생화학지, 13, 4, 1980.
  34. Bersani C., Soncini G., Canton C. : Evaluation of mutagenic activity in essences and spices by the Ames test, Archivio Veterinario Italiano, 32, 1/2, 10~11, 1981.