J. Fd Hyg. Safety 10(3), 133 - 138(1995)

현미의 *in vitro* 항돌연변이 활성 및 물리화학적 특성

전향숙 · 김인호
한국식품개발연구원 쌀이용연구센터

In vitro Antimutagenic Activity of Brown Rice and its Physico-Chemical Characteristics

Hyang-Sook Chun and In-Ho Kim
Rice Utilization Research Center, Korea Food Research Institute, Kyonggi-Do 463-420, Korea

ABSTRACT—*In vitro* antimutagenic activity of methanol extract from brown rice and its physico-chemical characteristics were investigated using *Salmonella typhimurium* reversion assay and SOS chromotest. Methanol extracts of brown rice were not mutagenic compared with direct and indirect mutagenicities of 4NQO (4-nitroquinoline oxide), 2NF(2-nitrofluorene), Trp-p-1(3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-[4,3-b]indole), and Trp-p-2(3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole). Antimutagenic activity against the indirect mutagenicities induced by Trp-p-1, Trp-p-2 and AFB_1 (aflatoxin B_1) was found in methanol extract. Even though antimutagenic activity showed dose-dependent, it remained constant at inhibition rate ranging 60%~90% when the concentration was above 3mg/plate in the *S. typhimurium* reversion assay and 0.2~0.6 mg/assay in the SOS chromotest. The antimutagenic activity of the methanol extracts was stable at various pH (2, 7 and 10), temperatures (60, 80 and 100°C) and heating times (2, 4, 6, 8 and 10 min at 100°C).

Key word □ Brown rice, Methanol extract, Antimutagenic activity, Mutagenicity, *Salmonella typhimurium* reversion assay, SOS chromotest

산업화와 더불어 발암물질 및 DNA의 손상을 일으키는 변이원성 물질에 인체가 노출될 가능성이 증가되었을 뿐만 아니라 식생활 환경이 복잡하고 다양해짐에 따라 암의 발병율이 높아지고 있다. 우리나라의 경우에도 암은 주요 사망원인이 되고 있어 암의 예방 및 치료를 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 식품성분 중에서도 종양이나 돌연변이원에 대한 억제효과를 비롯하여 여러가지 생리적 기능에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.[1]

쌀은 우리나라 농업의 주요 기간작목 및 식량자원으로써 1970년대의 녹색혁명 이후로 다수확 품종개발과 가공적 측면에서 연구가 이루어져 왔으며,[2,3] 영양적으로도 주로 탄수화물 급원으로만 인식되어 왔으나 최근 여러 생리적 기능들[4-6]이 있음이 알려지고 있다. 특히 암과 관련하여 현미와 미강 식이섬유의 항암 효과가 미국 NCI(national cancer institute)의 designer food program을 통하여 보고[7]된 바 있어 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 현미의 암과 관련된 연구들은 효능 검색에 그치고 있을 뿐 억제활성을 나타내는 물질의 특성 및 억제기작등은 거의 연구되지 않고 있다.

따라서 본고에서는 여러가지 용매에 의한 쌀 추출물의 돌연변이 억제효과를 살펴본 전보[8]에 이어 발암과 돌연변이 간의 높은 상관을 바탕으로 발암원의 검출에 이용되고 있는 *in vitro* 시험법인 *Salmonella typhimurium* reversion assay(Ames test)[9,10] 및 SOS chromotest[11]로 현미 추출물의 돌연변이 및 항돌연변이 활성을 조사하고 억제활성에 미치는 pH와 온도의 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

쌀은 농촌진흥청 작물시험장에서 재배된 1991년도산 장려품종으로서 일반계의 일품벼를 주로 사용하였다. 돌연변이원으로서 2-nitrofluorene(2NF), aflatoxin B_1(AFB_1) 및 4-nitroquinoline oxide(4-NQO)는 Sigma Chemical Co.(U.S.A.)로 부터, 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido [4,3-*b*]indole

(Trp-p-1)와 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido [4,3-*b*]indole(Trp-p-2)은 Wako Chemical Inc.(Japan)로부터 구입하였으며 모든 시약은 특급품 이상을 사용하였다. Rat liver S-9(Aroclor 1254-induced)은 Organon Teknika Corp.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

시험균주

Salmonella typhimurium reversion assay에 사용한 시험균주는 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100으로서 유전공학센터의 유전자은행에서 분양받아 사용하였다. SOS chromotest에 사용한 *Escherichia coli* PQ37은 도핑 콘트롤 센터에서 제공받았으며 균주들은 유전형질[11-14]을 확인한 후 시험에 사용하였다.

현미 추출물의 조제

벼를 제현기(Satake rice machine, Japan)를 이용하여 왕겨를 분리시켜 현미를 만들고 분쇄기(cyclotec 1903 sample mill, Sweden)를 이용하여 60메쉬로 분쇄한 후 메탄올을 현미 중량의 10배(w/v)로 넣고 rotary shaker를 이용하여 25°C에서 회전속도 200 rpm으로 하룻밤 추출하였다. 이 추출물을 여과지(Toyo No.4)로 여과한 후 감압농축한 다음 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 고형물이 10%(w/v)가 되도록 희석하여 4°C에 보관하면서 돌연변이원성 및 억제시험에 사용하였다.

돌연변이 유발능 및 항돌연변이원성

추출물의 항돌연변이 효과는 *Salmonella typhimurium* reversion assay[10]를 주로 사용하였으며, SOS chromotest[11]를 이용하여 효과를 확인하고 비교하였다.

Salmonella typhimurium reversion assay의 경우 Maron과 Ames의 방법에 준한 preincubation test를 이용하여 현미 추출물의 돌연변이 유발능 및 억제효과를 조사하였다. 즉 돌연변이 유발능의 경우, 멸균된 cap tube에 4% S-9 mix 0.5 m*l* (대사활성화가 필요없는 경우, 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 ml)와 현미추출물 0.1 m*l* 또는 돌연변이원 0.1 m*l* 및 nutrient broth에서 하룻밤 배양된 균주 0.1 m*l* ($1\sim2\times10^9$ cells/m*l*)를 넣었으며, 돌연변이 억제효과의 경우는 현미추출물 0.1 m*l*과 돌연변이원 0.1 m*l*를 같이 넣어 주었다. 그런 다음 cap tube를 가볍게 vortex 한 후 37°C에서 20분간 예비배양하였다. 다음 45°C의 top agar 2 m*l*씩을 첨가하고 3초간 vortex한 후 미리 제조된 최소 글루코스 한천평판배지(minimal glucose agar plate) 위에 골고루 도말하여 37°C에서 48시간 배양후 복귀콜로니(revertant)의 수를 측정하였다. 이 때 첨가된 돌연변이원의 농도는 사용한 균주에 대하여 독성을 나타내지 않는 농도로써 4-NQO가 0.25 μg/plate, 2NF가 4 μg/plate, Trp-p-1, Trp-p-2 및 AFB_1의 경우는 1 μg/plate로 하였다. 각 실행마다 3개의 평판을 사용하였으며 독립된 실험을 2번 이상 실시하였다. 이 때 현미 추출물의 돌연변이 억제효과(inhibition rate)는 [(a-b)/(a-c)]×100으로 나타내었는데 여기서 a는 돌연변이원만 있을 때 복귀콜로니의 수, b는 현미 추출물과 돌연변이원을 동시에 첨가하였을때 복귀콜로니의 수, c는 돌연변이원 및 현미 추출물 모두 없는 경우의 복귀콜로니의 수이다.

SOS chromotest는 Quillardet 등[11,12]의 방법에 따라 실시하였다. 즉 *E. coli* PQ 37의 하룻밤 배양액을 La배지로 1:50(v/v) 희석하고 이를 37°C에서 약 2시간 진탕배양한 다음 (약 2×10^8cells/m*l*), 직접법의 경우 동 배양액을 La배지에, 간접법의 경우는 4% S-9 mix에 1:10으로 희석하였다. 이 배양액 0.6 ml, 돌연변이원 20 μ*l*, 현미 추출물 20 μ*l*를 시험관(돌연변이 유발능 시험의 경우 변이원과 현미 추출물을 각각 따로 넣어 주었으며 항돌연변이 시험의 경우는 동시에 넣어 주었음)에 넣어 SOS 반응을 유도한 다음 37°C에서 약 2시간 진탕배양한 후 β-galactosidase와 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. β-Galactosidase 측정은 2.7 m*l*의 B 완충액을 넣어 37°C에서 5~10분간 두어 온도를 균일화 한 후 o-nitrophenyl-β-galactoside(ONPG)용액을 0.6 m*l* 첨가하여 정색반응을 약 30분간 진행시킨 후 2 m*l*의 1 M Na_2CO_3용액을 넣어 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Alkaline phosphatase의 측정은 B완충액 대신에 P완충액을, ONPG용액 대신에 p-nitrophenyl phosphate(PNPP)용액을 사용한것 외에는 β-galactosidase 측정과 동일하며 반응의 정지를 위해서는 0.25 M HCl 1 m*l*를 넣고 5분 후 2 M tris(hydroxymethyl)aminomethane 1 m*l*를 첨가하였다. 효소활성은 [$1000\times A_{420}/t$]으로 나타내었는데 여기서 t는 반응시간(분) 이다. β-galactosidase unit의 alkaline phosphatase unit에 대한 비율을 R(ratio)값으로 나타내어 검색 대상 물질이 단백질 합성 저해작용을 나타내는 경우에도 sfi A 유전자의 발현을 표현하였다. SOS 유전자의 유도(induction) 정도를 나타내는 IF(induction factor)는 R(C)/R(0)로 나타내었는데 R(C)는 변이원이나 현미 추출물이 있을 때의 ratio값이며, R(0)는 돌연변이원이나 현미 추출물이 없을때의 ratio값이다.

현미 추출물의 pH 및 가온처리

현미 메탄올 추출물 0.1 g에 HCl과 NaOH로 pH를 2, 7 및 10으로 조정한 증류수 5 m*l*를 각각 첨가하여 고르게 용해시킨 후 질소 충전하에 상온에서 3시간 처리한 다음 각각의 짝산과 짝염기로 중화하였다. 그런 다음 증류수 10 m*l*로

5회 이상 세척과 여과(Toyo No. 4)를 반복하여 증화액의 염을 제거한 후 60°C에서 감압건고시켜 10배(w/v)의 DMSO 용액으로 희석하여 항돌연변이 활성에 대한 pH의 영향을 측정하였다.

가온시간이 항돌연변이 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 현미 메탄올 추출물 0.1 g을 60°C, 80°C 및 100°C의 항온수조에서 10분간 처리하였으며, 가열시간의 영향은 100°C 항온수조에서 2분, 4분, 6분, 8분 및 10분간 정치시킨 다음 냉각하여 DMSO에 용해시킨 후 항돌연변이 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

현미 추출물의 돌연변이 활성

현미 메탄올 추출물의 돌연변이 억제 활성을 살펴보기에 앞서 *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest로 돌연변이 유발 여부를 알아본 결과는 Table 1, 2와 같다. *Salmonella typhimurium* reversion assay의 경우 직접법 및 대사활성화를 적용한 간접법 시험에서 현미 메탄올 추출물은 음성 대조구인 DMSO의 His+ 집락수와 비교적 큰 차이를 나타내지 않았으며, 용량-반응관계도 보이지 않았다.

SOS chromotest의 경우 직접 시험법에서는 추출물의 IF값이 0.920~1.092로서 음성 대조구의 IF값 1.000과 비교하여 0.92~1.09배를 나타내었으며 간접법의 경우 1.189~1.447로서 음성대조구에 비하여 1.19~1.45배의 IF값을 보였고 용량-반응관계를 나타내지 않았다.

이상의 두가지 변이원성 시험에서 현미 메탄올 추출물은 '음성'의 결과를 나타내었고, 용량-반응관계도 보이지 않은 것으로 보아 돌연변이 유발능은 없는 것으로 판단된다. 특

Table 1. Direct and indirect mutagenicity of methanol extract from brown rice by *Salmonella typhimurium* reversion assay

Dose of methanol extract(mg/plate)	No. of revertants[1]	
	Direct	Indirect
Positive control[2]	991±205	2615±460
Negative control[4]		42±7
(Spontaneous)	25±5	
10	114±35	59±2
5	98±21	66±12

[1] Values are means±standard deviation.
[2] 2-Nitrofluorene (4 μg/plate) as a direct acting mutagen and Trp-p-1 (1 μg/plate) as an indirect acting mutagen were used.
[3] DMSO was used as a negative control.

Table 2. Direct and indirect mutagenicity of methanol extract from brown rice by SOS chromotest

Direct or Indirect	Dose of methanol extract(mg/assay)	β-Galactosidase		Alkaline phosphotase		R	Induction factor
		OD420	unit	OD420	unit		
Direct	Negative control[1]	0.081	2.70	0.934	31.13	0.087	1.000
	Positive control[2]	0.861	28.70	0.786	26.20	1.095	12.586
	2.0	0.087	2.90	1.144	36.13	0.080	0.920
	6.0	0.089	2.97	1.058	35.27	0.084	0.966
	10.0	0.090	3.00	1.067	35.57	0.084	0.966
	16.0	0.098	3.27	1.038	34.60	0.095	1.092
	20.0	0.097	3.23	1.003	33.43	0.095	1.092
	Negative control[1]	0.129	4.30	0.488	16.27	0.264	1.000
	Positive control[3]	0.257	8.57	0.390	13.00	0.659	2.496
Indirect	2.0	0.087	2.90	0.277	9.23	0.314	1.189
	6.0	0.073	2.43	0.196	6.53	0.372	1.409
	10.0	0.082	2.73	0.209	6.97	0.392	1.485
	16.0	0.091	3.03	0.245	8.17	0.371	1.405
	20.0	0.091	3.03	0.238	7.93	0.382	1.447

[1] DMSO as a negative control was used in SOS chromotest.
[2] 4-NQO(1 μg/assay) as a direct acting mutagen was used.
[3] Trp-p-2(4 μg/assay) as an indirect acting mutagen was used.

히 SOS chromotest는 DNA손상의 결과인 돌연변이의 생성을 직접 측정하는 *Salmonella typhimurium* reversion assay와는 달리 DNA손상과 돌연변이의 중간단계라 할 수 있는 SOS유도를 측정하는 것이므로 이 두 시험법에 의해 평가된 변이원성의 정도가 잘 일치한다는 것은 현미 메탄올 추출물의 변이원성 결과가 의음성(false negative)일 가능성은 희박하다는 것을 시사하는 결과였다고 사료된다.

현미 추출물의 항돌연변이 활성

현미 메탄올 추출물의 항돌연변이 억제 활성을 *Salmonella typhimurium* reversion assay 및 SOS chromotest로 알아본 결과를 Fig. 1, 2 및 3에 나타내었다. Trp-p-1으로 돌연변이를 유도한 TA 98주에 있어서 1~11 mg/plate로 추출물량을 변화시켰을 때 약 40~98%의 항돌연변이 활성을 나타내었다. 현미 메탄올 추출물의 활성은 1~3 mg/plate (5% w/v) 사이의 추출물 농도에서는 항돌연변이 활성이 농도에 비례하여 나타났으나, 5 mg/plate 이상의 추출물 농도에서는 90% 이상의 저해율을 나타내어 농도증가와 무관하게 활성이 유지되었다. 또한 현미 메탄올 추출물의 농도가 증가하였을 경우에도 시험균주의 background lawn이 존재함을 육안으로 관찰하였다.

SOS chromotest의 경우도 마찬가지로 Trp-p-2 및 aflatoxin B_1으로 유도한 SOS 반응에 대해 억제활성을 나타냈으나 *Salmonella typhimurium* reversion assay에 의한 저해효과 보다 낮게 나타났다. 즉 Trp-p-2로 돌연변이를 유도한 경우에는 추출물 농도 0.6~11 mg/assay 이상에서 62~79%의 억제활성을, AFB_1으로 유도한 돌연변이에 대해서는 0.2~11 mg/assay 이상의 농도에서 62~76%의 일정한 억제

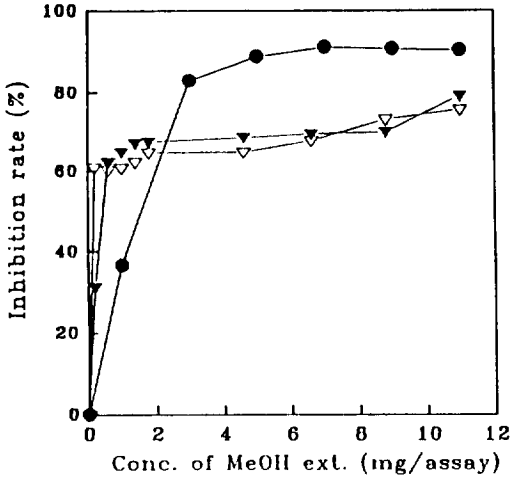

Fig. 1. Antimutagenic activity of methanol extract from brown rice against mutagenicities induced by Trp-p-1, Trp-p-2 and AFB_1.

●, *S. typhimurium* reversion assay(Trp-p-1); ▽, SOS chromotest(AFB_1); ▼, SOS chromotest(Trp-p-2).

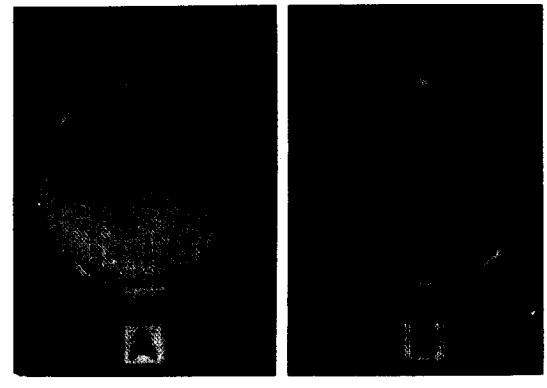

Fig. 2. Photograph showing inhibitory effect of the methanol extract from brown rice on indirect mutagenicity of Trp-p-1 in the *S. typhimurium* (TA 98) reversion assay.

A: Positive control(Trp-p-1), B: Mutagen+methanol extract

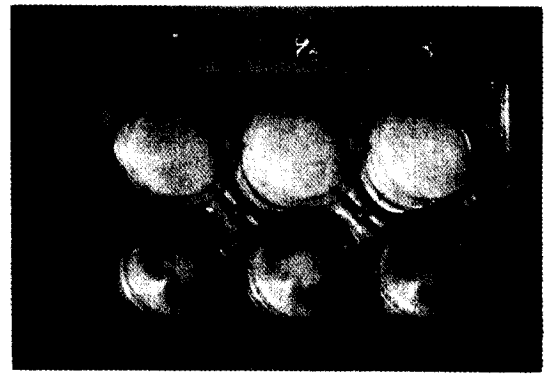

Fig. 3. Photograph showing inhibitory effect of the methanol extract from brown rice on indirect mutagenicities of AFB_1, Trp-p-1 and 4NQO in the SOS chromotest.

A: Positive control(Trp-p-1) B: Mutagen+methanol extract, 1. AFB_1, 2. Trp-p-1, 3. 4NQO

수준을 유지하여 *Salmonella typhimurium* reversion assay에 의한 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

이와 같은 결과를 살펴 볼 때 현미 메탄올 추출물은 돌연변이원성은 없으면서 Trp-p-1, Trp-p-2 및 AFB_1으로 유도된 돌연변이에 대해 억제활성을 나타내었으며, 억제활성은 일정 농도까지는 비례하여 증가하지만 그 이상의 농도에서 농도와 무관하게 높은 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 쌀과 같이 상식하는 식품중 유효성분의 섭취량은 그 용량을 규정하기가 곤란한 점을 고려하면 현미의 돌연변이 억제활성이 일정량 이상의 농도에서 용량의존적으로 증가하지 않은 것은 이에 부합되는 결과였다고 사료된다. 또한 항돌연변이 효과의 측정에 있어 활성이 세포독성에 기인되어 나타날 가능성도 높으나 본 실험의 경우 *Salmonella typhimurium* reversion assay에 의한 시험에서 시험균주의 background lawn이 존재함이 관찰됨으로서 균주의 생육저해나 치사작용등의 세포독성에 기인된 억제활성은 아니라고 판단되며, 향후 이에 대한 자세한 구명과 아울러 활성물질의 분리 및 동정과 작용기전 등이 더 연구되어야 할 것이다.

현미 항돌연변이 물질의 물리화학적 특성

돌연변이 억제 활성이 나타난 현미 메탄올 추출물에 대하여 *Salmonella typhimurium* reversion assay와 SOS chromotest를 이용하여 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 즉 산(pH 2)과 알카리(pH 10)의 조건에서 *Salmonella typhimurium* reversion assay에 의한 경우 약 90%,

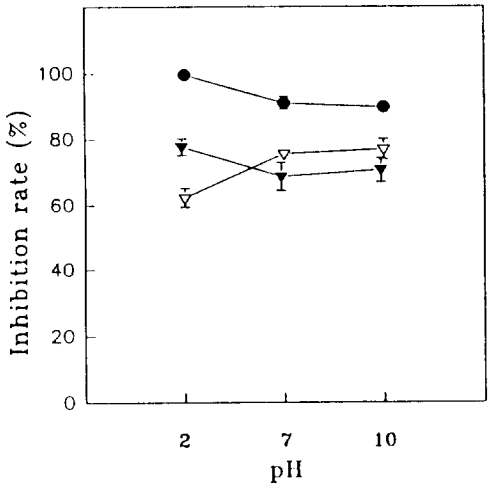

Fig. 4. Inhibitory effect of the methanol extract from brown rice treated at various pH on the chemically induced mutagenesis.

●, *S. typhimurium* reversion assay(Trp-p-1); ▽, SOS chromotest(AFB_1); ▼, SOS chromotest(Trp-p-

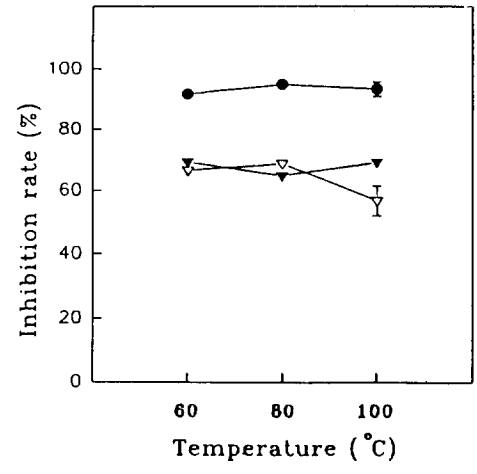

Fig. 5. Inhibitory effect of the methanol extract from brown rice heated to various temperature on the chemically induced mutagenesis.

●, *S. typhimurium* reversion assay(Trp-p-1); ▽, SOS chromotest(AFB_1); ▼, SOS chromotest(Trp-p-2).

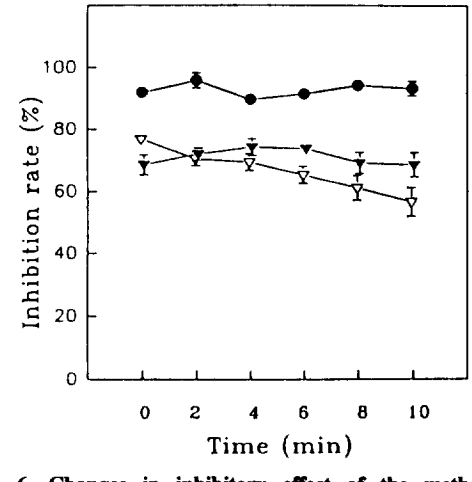

Fig. 6. Changes in inhibitory effect of the methanol extract from brown rice heated on the chemically induced mutagenesis as a function of heating time at 100°C.

●, *S. typhimurium* reversion assay(Trp-p-1); ▽, SOS chromotest(AFB_1); ▼, SOS chromotest(Trp-p-2).

SOS chromotest에 의한 경우 약 70% 이상의 돌연변이 억제활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 pH 1.5~2.0 범위로 유지되는 위에서 뿐만 아니라 pH가 다시 6.5~ 7.5로 변화하면서 대부분의 흡수가 일어나는 십이지장 등 소화기관의 pH조건을 감안할 때 소화기관을 통과하여 흡수가 되는 동안에도 현미의 항돌연변이 활성이 유지될 가능성이 높을 것으로 추론된다.

또한 항돌연변이 활성에 있어서 현미 메탄올 추출물의 열안정성을 알아보기 위하여 60℃, 80℃, 100℃에서 각각 10분간 가온후 돌연변이 억제활성을 시험한 결과 *Salmonella typhimurium* reversion assay에서 90%, SOS chromotest에서 약 64% 이상의 활성을 유지하였다(Fig. 5).

100℃에서 2분부터 10분까지 가열시간을 달리하여 항돌연변이활성을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 가열시간이 증가하여도 *Salmonella typhimurium* reversion assay의 경우 약 90%, SOS chromotest의 경우 약 70%이상의 활성을 유지하는 것으로 나타나 쌀에 존재하는 돌연변이 억제물질은 열안정성이 있는 물질인 것으로 조사되었으며 조리, 가공시의 열처리에 의해서도 활성이 유지되는 비교적 안정한 물질일 가능성이 시사되었다.

국문요약

Salmonella typhimurium reversion assay 및 SOS chromotest를 이용하여 현미 추출물의 돌연변이 유발능 및 항돌연변이성을 알아보았으며, 현미의 항돌연변이성 물질의 pH 및 열안정성을 살펴보았다. 간접 및 직접 변이원 [3-amino-1,4 -dimethyl-5H-pyrido [4,3-b]indole(Trp-p-1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole(Trp-p-2), 2-nitrofluorene(2NF), 4-nitroquinoline oxide(4-NQO)]의 변이원성과 비교하였을때 현미 메탄올 추출물의 돌연변이 유발능은 없는 것으로 나타났다. 반면, 현미 메탄올 추출물은 Trp-p-1, Trp-p-2 및 AFB_1으로 유도된 돌연변이에 대해 억제활성을 나타내었으며, 억제활성은 일정 농도까지는 비례하여 증가하지만 그 이상의 농도에서는 농도와 무관하게 높은 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 현미 메탄올 추출물은 pH(2, 7 및 10), 온도(60, 80, 및 100℃) 및 가열시간(100℃에서 2, 4, 6, 8, 10분)을 달리하였을 때도 70% 이상의 억제활성을 나타내어 pH 및 열안정성이 관찰되었다.

참고문헌

1. Hayatsu, H., Arimoto, S. and Negishi, T.: Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mut. Res.*, **202**, 429(1988).
2. 崔海春, 李鍾燮, 池定鉉: 미질개선연구. 농진청작물시험장 시험보고서(1991).
3. 이현유, 한억, 이상효, 권상오, 김성수, 오상룡, 민병용: 쌀을 이용한 압출형 가공식품 개발 연구. 한국식품개발연구원 보고서 G1007-0198(1992).
4. 村元學, 河村幸雄: 米タンパク質と米タンパク由來の抗血壓上昇性(アンギオテンシン變換 酵素阻害) ペプト. 日本食品工業, **34**, 18(1991).
5. Hosoyama, H., Oosawa, M. and Hamano, M.: *Bifidobacterium* growth promoting substance in rice bran koji extract. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 940(1991).
6. Miwa, M., Kong, Z.L., Shinohara, K. and Watanabe, M.: Macrophage stimulating activity of foods. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1863(1990).
7. Duxbury, D.D.: Fiber; form follows function, *Food Processing*, **54**, 44(1993).
8. 전향숙, 김인호, 김영진, 김길환: 쌀 추출물의 돌연변이 억제효과, 한국식품과학회지, **26**, 188(1993).
9. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.*, **31**, 347(1975).
10. Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella mutagenicity* test. *Mut. Res.*, **113**, 173(1983).
11. Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R. and Hofnung, M.: SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Acad. Sci.(USA)*, **79**, 5971(1982).
12. Quillardet, P., Bellecombe, C.D. and Hofnung, M.: The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Validation study with 83 compounds. *Mut. Res.*, **147**, 79(1985).