

碩士學位論文

투스 메탄을 抽出物의 抗突然變異 活性



濟州大學校 大學院

食品工學科
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

鄭 昌 華

1999年 12月

톳 메탄을 抽出物의 抗突然變異 活性

指導教授 金 洙 賢

鄭 昌 華

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

1999年 12月

 제주대학교 중앙도서관
鄭昌華의 工學碩士學位 論文을 確認함.

審査委員長 송 대진 
委 員 조 수현 
委 員 河 雅 桓 

濟州大學校 大學院

1999年 12月

**Antimutagenic Activity of Methanol Extracts of
*Hijiki(Hizikia fusiforme)***

Chang-Hwa Jung

(Supervised by Professor Soo-Hyun Kim)

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

**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

1999. 12

목 차

Summary

I. 서론	1
II. 연구사	4
1. <i>Salmonella typhimurium</i> LT-2 histidine 요구주	4
2. 식품에서의 돌연변이원성 물질	6
3. 돌연변이원성 억제 효과	8
4. 해조류의 생리활성 효과	10
5. 톳의 돌연변이원성 억제효과	11
III. 재료 및 방법	13
1. 실험재료	13
2. 시료의 추출	13
3. 항변이원성의 검색	15
1) 표준돌연변이원	15
2) 지표균주	15
3) 균주의 동정	15
(1) Histidine과 biotin 요구성	16
(2) Deep rough(<i>rfa</i>) 돌연변이	16
(3) <i>uvrB</i> 돌연변이	16
(4) R-factor 돌연변이	17
4) 균주의 보관 및 배양	17
(1) 냉동보존	17
(2) Master plate의 제조	17

(3) 시험균주의 전배양	18
5) 표준들연변이원의 dose-response	18
6) Spot test	18
7) 항변이원성 실험	19
4. HPLC에 의한 항들연변이원성 물질의 분리	19
1) 시료의 전처리	19
2) 검출파장	19
3) 이동상	19
5. 분리된 물질의 항들연변이 효과 재검정	20
IV. 결과 및 고찰	21
1. 추출수율	21
2. 표준들연변이원의 dose-response	22
3. 항들연변이원성 효과	29
1) 톳 메탄을 분획물의 들연변이원성	29
2) 톳 메탄을 분획물의 항들연변이원성	32
4. 항들연변이 물질의 분리	39
1) 검출파장 선택	39
2) 이동상의 선택	40
3) HPLC에 의한 분획	41
5. 분리된 물질의 항들연변이 효과에 대한 재검정	44
V. 요약	48
VI. 참고문헌	49

Contents of Tables

- Table 1. Genotype of the *S. typhimurium* TA strains used for mutagens testing
- Table 2. Extractions yield of *Hijiki(Hizikia fusiforme)* by various solvents.
- Table 3. Mutagenic activity of fractions obtained from 3hr-methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 4. Mutagenic activity of fractions obtained from 12hr-methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 5. Antimutagenic effects on ICR191-induced mutation of fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 6. Antimutagenic effects on NPD-induced mutation of fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 7. Antimutagenic effects on NPD-induced mutation of fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 8. Antimutagenic effects on 4-NQO-induced mutation of fraction obtained from methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 9. Antimutagenic effects on 4-NQO-induced mutation of fraction obtained from methanol extracts of *Hijiki(Hizikia fusiforme)*
- Table 10. Condition for analysis of *Hijiki(Hizikia fusiforme)* extracts by HPLC
- Table 11. Antimutagenic effects for mutations by compound RT 2.4 purified from hexane fraction

Contents of Figures

- Fig. 1.* Scheme for fractionation of methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).
- Fig. 2.* Dose-response of *S. typhimurium* TA97 to ICR191.
- Fig. 3.* Spot test of *S. typhimurium* TA97 for ICR191.
- Fig. 4.* Dose-response of *S. typhimurium* TA strains to NPD.
- Fig. 5.* Spot test of *S. typhimurium* TA98 for NPD.
- Fig. 6.* Spot test of *S. typhimurium* TA100 for NPD.
- Fig. 7.* Dose-response of *S. typhimurium* TA strains to 4NQO.
- Fig. 8.* Spot test of *S. typhimurium* TA100 for 4NQO.
- Fig. 9.* Spot test of *S. typhimurium* TA102 for 4NQO.
- Fig. 10.* UV-absorption spectrum of hexane fraction obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).
- Fig. 11.* UV-absorption spectrum of fractions obtained from methanol extracts of the *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).
- Fig. 12.* HPLC analysis of fractions obtained from the *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).
- Fig. 13.* HPLC analysis of hexane fraction obtained from the *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).
- Fig. 14.* HPLC profile of compound separated from hexane fraction.
- Fig. 15.* Plate test for ICR191-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA97.
- Fig. 16.* Plate test for NPD-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA98.
- Fig. 17.* Plate test for 4NQO-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA100.
- Fig. 18.* Plate test for 4NQO-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA102.

Summary

The study was carried out to investigate the antimutagenic activities against hexane, chloroform, ethyl acetate and aqueous fractions obtained from methanol extracted of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*) in Ames test.

Antimutagenic effects of methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*) were up to 80%, antimutagenic effects of each fraction obtained from methanol extracts showed that solvent fractions were higher than aqueous extracts in the inhibition effects on mutagens in *Salmonella typhimurium* TA strains. By increasing amount of sample, it showed higher antimutagenic activity.

In frameshift mutant, TA97 and TA98, it was found that all samples show appreciable antimutagenic activities. n-Hexane fraction among these fractions showed the highest inhibition rate on the mutagenicities of ICR191 and NPD. In base substitute mutant, n-hexane fraction showed high antimutagenic effects against NPD and 4-NQO, too.

Antimutagenic effects based on time showed the higher 3hrs extracts in aqueous fraction. Solvent fraction has only few differences.

Hexane fractions that showed the highest antimutagenic effects are analyzed by HPLC. Hexane fraction was further fractionated into four fractions by HPLC. purified RT2.4 contained the highest amount of in the four compounds of n-hexane fraction which showed high antimutagenic activity on ICR191, NPD and 4-NQO.

I. 서론

현대 산업의 급진적인 발전으로 우리 주위에서 암을 발생시킬 요인들이 상당히 많아졌으며 매우 복잡한 기구(mechanism)를 가지는 것으로 알려지고 있다. 이러한 암발생 요인으로는 유전적, 인종과 지리학적 요인, 연령, 암 유전자의 활성화 및 종양 억제 유전자의 결손에 의한 분자생물학적 요인, 방사선, 화학물질, 균류 독성물질(Aflatoxin B₁ 등), 호르몬의 과잉 혹은 불균형, 바이러스 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(김과 임, 1996). 그러나 암의 발생은 주로 인간이 섭취하고 있는 음식물에서 여러 가지 화학성분이나 조리, 저장과정 중에서 생성되는 발암물질에 의해 일어날 가능성이 높다. 미국이나 일본의 암연구 학계에서는 전체 암의 원인 중 60%가 이러한 요인에 발생된다고 보고하고 있다(류, 1991).

현재 암의 퇴치를 위한 많은 연구가 이루어지고 있으나 암의 치료에 의한 부작용이 수반되면서 부작용이 없거나 심각한 부작용을 수반하지 않는 항암제 개발이 절실하게 요구되고 있다. 그 결과로 항암효과를 보이면서 부작용이 적은 식품 중의 유효성분에 대한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다(황 등, 1990). 외국의 경우 식품의 기능성 규명 및 활성화 성분을 식품에 응용할 목적으로 세부 전문별로 체계적이고 장기적인 시도를 하고 있다(Human, 1993)

식품 중에 존재하는 발암원은 크게 세 가지로 분류되는데, 첫 번째 mycotoxin 들에 의한 것, 두 번째는 음식의 저장, 가공, 조리 중에 발생하는 화학물질들, 세 번째는 인공첨가물 유도체에 의한 것으로서 이 중에서도 식품의 가공 조리시에 발생하는 발암성 물질은 노출되는 정도와 발암의 가능성이 가장 높기 때문에 더욱 중요시되고 있다(Sugimura, 1983).

식품 중에는 항변이원성 인자들이 발암성을 저해하며, 암예방에도 효과가 있다는 연구 결과들이 보고되고 있으며(Hayatsu 등, 1988), 인간의 식사에는 자연적인 돌연변이 유발 요인과 발암의 다양한 요소들이 함유되어 있을 뿐만

아니라 그것을 억제할 수 있는 요소들도 함께 존재하고 있다(Bronzetti, 1994).

최근 식품을 비롯한 각종 천연물을 대상으로 변이원을 억제시키는 생리활성물질들의 검색이나 작용기구에 관한 연구가 세계적으로 활발히 이루어지고 있는데, 지금까지 보고되고 있는 항돌연변이 및 항암 효과 인자를 보면 녹황색 채소의 β -carotene과 vitamin A, E, C 등의 비타민류(Shinohara 등, 1988), 녹차의 catechin(Steele 등, 1985), dietary fiber류(Lai 등, 1980), chlorophyll 및 chlorophyllin 등의 색소류(Ong 등, 1986), 약용식물의 tannins과 flavonoid(Hayatsu 등, 1988) 등이 분리 동정되고 있고, 또한 마늘의 allicin을 비롯한 함황 화합물과 linoleic acid계 물질이 항돌연변이 및 항암작용이 있는 것으로 보고되고 있다(Hayatsu 등, 1981; Lim 등, 1997).

해조류는 동아시아, 동남아시아 지역에서 식용되어 왔으며, 육상식물 중에는 존재하지 않는 알긴산과 한천 등의 점질성 다당류가 많이 함유하고 있어서 항암 가능성이 예견되고 있다(Lahaye, 1991; Nishimune 등, 1991). 이들 해조 다당류는 인체에서 분비하는 효소에 대해 난소화성으로 식물섬유라 부르고 있다. 갈조류에는 저장다당류로서 β -1,3 결합 glucan을 주축으로 하는 laminaran과 α -1,2 결합 fucose에 C-4에 황산기가 결합된 fucoidan이 있는데, 이것은 전분과는 다른 식물섬유로 이들에 대한 생리활성에 관한 연구가 진행되어 왔다(久田, 1999).

해조류 중 툃(*Hizikia fusiforme*)은 갈조식물(*Phaeophyta*) 모자반과의 바닷말로서, 우리 나라에서는 주문진 이남에서 서해안과 남해안 및 제주도에 서식하는 천연자원 식물이다(조, 1998). 특히 제주도 연안에서 생육하고 있는 해조류 중 생산량이 가장 높고, 금액으로도 어촌계의 소득원의 주종을 이루고 있으며(국립수산물검사소, 1996), 과거에는 영양적으로 각광을 받지 못했으나 해조 다당류가 장의 활동을 원활하게 하고, 식염, 중금속의 흡착배출, 콜레스테롤의 혈관 내 침착 방지 등의 효과가 높다는 것이 밝혀졌고, 최근에는 당류성분에 항변이 및 항암작용이 있다고 보고되고 있다(Cho 등, 1998; 김 등, 1995; Noda 등, 1989; 박 등, 1998).

툇의 항변이원성 실험에서 지금까지 보고되는 연구에 의하면 단순한 물추출물과 용매별 추출물에 대한 실험은 이루어지고 있으나 아직까지 툇의 항변이에 작용하는 물질 규명에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 툇을 메탄올로 추출한 후 증류수, hexane, chloroform 및 ethyl acetate 로 순차적으로 분획하여 Ames 시험계를 이용하여 변이원 물질인 2-methoxy-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine(ICR-191), 4-nitroquinoline-*N*-oxide(4-NQO) 및 4-nitro-*o*-phenylenediamine(NPD)에 의해 유도되는 돌연변이의 억제효과를 검정하였다. 또한 항변이원성이 가장 높은 hexane 분획물을 high performance liquid chromatography(HPLC)로 분리 분획한 후 이 중 함량이 가장 많은 획분에 대한 돌연변이 억제효과를 검정함으로써 툇에 함유되어 있는 항변이원성 물질을 규명하고자 하였다.

II. 연구사

1. *Salmonella typhimurium* LT-2 histidine 요구주

발암물질과 변이원 물질간의 관계에 대한 연구들로부터 돌연변이를 유발하는 물질의 약 83%가 발암물질로 알려지고 있고(Ames, 1979; Ames와 McCann, 1982; Maron과 Ames, 1983; McCann과 Ames 등, 1975; McCann 등, 1975), 이들 변이원들은 체세포 돌연변이를 일으켜 암을 유발시키는 것으로 추정되고 있다(Ames 등, 1975). 변이원의 발암능(發癌能)을 검정에는 여러 가지 방법들이 이용되고 있는데, 이 중 *Salmonella typhimurium*의 histidine auxotroph를 이용한 Ames 등(1973)의 방법은 짧은 시간 내에 많은 시료를 검정할 수 있는 비교적 간단한 방법으로 알려지고 있어서 화학물질의 돌연변이원성 실험에 널리 이용되고 있다(Ames 등, 1975; Committee 17 Appointed Council EMS, 1975; Rinkus와 Legator, 1979).

*S. typhimurium*을 이용한 변이원성 검정은 초기에는 *S. typhimurium* LT-2 histidine auxotroph 균주의 복귀돌연변이 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 ampicillin 저항인자 pKM101(McCann 등, 1975)을 도입시킨 TA98과 TA100 균주 및 tetracycline 저항인자 pAQ1(Levin 등, 1982)을 도입시킨 TA102 균주가 분리되어 표준 변이원성 검정에 이용되고 있다.

또한, *in vitro*에서 간접적으로 포유동물의 생체 대사작용과 유사 조건으로 한 비활성물질들이 생체 내에 흡수되어 활성화된 후 돌연변이를 일으킬 가능성 여부를 밝히기 위하여, 포유동물의 간 microsome 효소 복합체(liver microsome enzyme complex)인 S-9를 도입하여 활성인자로 사용하고 있다(Ames 등, 1975).

시험균주 TA97은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph 중에서 구

조이동성 돌연변이 균주(frame shift mutant)인 hisD6610을 모균으로 하여 hisD6610 돌연변이 부위에 추가적으로 6개의 cytosine을 연결시킨 것으로서, 화학물질에 대한 투과성을 높이기 위해 세포벽의 구성성분인 lipopolysaccharide가 부분적으로 결여된 deep rough(*rfa*) 돌연변이와 DNA 절제 수선시스템(excision repair system)을 코딩하는 유전자를 결여시킨 *uvrB* deletion 돌연변이를 가진 TA1537 균주에 ampicillin 저항자인 plasmid pKM 101을 도입하여 감수성을 높인 균주이다(Levin 등, 1982).

TA98은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph) 중 구조이동성(frame shift) 변이원인 hisD3052를 모균으로 하여 *uvrB* 절제 능력을 가진 균주인 TA1538에 ampicillin 저항인 plasmid pKM101의 도입으로 감수성을 높인 균주이다. HisD3052는 histidine dehydrogenase를 coding하는 hisD 유전자에 돌연변이를 일으킨 것으로 보통 구조이동성 돌연변이(frame shift mutation)가 일어난 부근에 8개의 반복되는 -GC- 잔기들을 가지고 있다(Isono와 Yourno, 1974).

TA100은 *S. typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph)중 염기치환 변이원(base repair mutant)인 his G46을 모균으로 하여 deep rough(*rfa*) 돌연변이와 *uvrB* deletion 돌연변이를 가진 TA1535에 ampicillin 저항자인 plasmid pKM 101의 도입으로 감수성을 높인 균주이다. His G46은 histidine 생합성의 최초 효소를 coding하는 his 유전자에 돌연변이를 유발시킴으로써 DNA 염기서열(sequence)의 분석시 야생형(wild type)의 -CAC-/-CTC- (leucine)이 -GGG-/-CCC-(proline)으로 전환되어 있다(Levin 등, 1982).

TA102는 염기치환성 돌연변이 균주(base substitution mutant)인 hisG428을 모균으로 하여 deep rough(*rfa*)와 plasmid인 pKM101과 pAQ1 (tetracycline 저항인자)을 도입한 균주이다(Levin 등, 1982).

2. 식품에서의 들연변이원성 물질

식품에서 변이원성을 나타내는 여러 화합물들이 확인되고 있고, 이들 변이원들은 여러 소화기관에서 식사와 암발생물간의 관계에서 주요 역할을 하고 있다(Doll과 Peto, 1981). 식품 중의 발암성 물질은 그 대부분이 식품의 가공, 저장 및 조리 중에 생성되는데, 최근에는 환경오염에 의한 혼입으로 발생하는 암발생율도 증가하는 추세이다(김과 임, 1996). 식품공업적인 관점에서 식품의 가공, 저장과정에서 2차적으로 생성되는 변이원 물질 중 관심이 집중되고 있는 대표적인 예를 들면 아질산염과 아민과의 반응으로 생성되는 nitrosamine류(Hotchkiss 등, 1981; Hotchkiss, 1988), 곰팡이의 발육으로 생성되는 aflatoxin류(박, 1984), 식품 성분의 가열 분해로 생성되는 benzopyrene(Lijinsky, 1991) 및 식품 성분간의 상호작용으로 생성되는 heterocyclic amine(Wakabayashi, 1992) 등이 있다.

Nitrosamine은 강력한 발암물질로서 1956년에 Magee와 Barnes에 의해서 *N*-nitrosodimethylamine의 발암성이 보고된 이래 많은 종류의 nitrosamine의 발암성이 입증되었다. Nitrosamine의 생성은 식품의 조리, 가공, 보존 과정에서 아질산과 아민류의 반응에 의한 경우와 타액 중에 분비되는 초산이온에 의해 유래하는 아질산이 경구섭취 후 위 내에서 식품 중의 아민류와 반응하는 경우로 대별되고 있다(大澤, 1990). Nitrosamine은 산성 pH에서 쉽게 생성되는데, Mirvish(1970)는 그 최적 생성 pH가 3.4이고, Scanlan(1983)도 이는 인체의 위액 pH 조건과 유사하므로 인체의 위 내에서 생성될 가능성이 매우 높다고 하였으며, 또한 중성부근의 pH를 갖는 대부분의 식품에서는 가열에 의해서도, 그리고 formaldehyde나 장내세균과 같은 촉매제가 있을 경우 중성이나 알칼리성 영역에서도 생성된다는 보고들이 있다(Oshima와 Kawabata, 1977; Yang 등, 1987).

국내에서의 nitrosamine의 생성에 관한 보고에 따르면 우리나라에서 많이 발생하는 위암과 관계가 있으리라 추정되고 있으며(구 등, 1999a), 김치와 김치 부재료에서 nitrosamine의 검출(구 등, 1999b; 오, 1997)과 수산제품

에서의 nitrosamine의 검출에 대한 연구(Lim 등, 1997)들이 보고되고 있다.

곰팡이의 발육으로 생성되는 aflatoxin류는 *Aspergillus flavus*와 그 유사종들에 의해 2차 대사물로 생성되는 mycotoxin 중의 하나이다(박, 1984). Aflatoxin류 가운데 중요한 화합물로는 자외선 하에서 강하게 발광하는 B₁, B₂, G₁, G₂들이며 그 외 M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a}, parasiticol, aflatoxicol과 GM₁ 등이 소량 존재한다(Patterson, 1977). 그 중에서도 Aflatoxin B₁은 변이원성이 매우 강한 것으로, 생체 내에서 간의 혼합효소계(mixed function oxidase system: MFO)에 의해 대사활성화 되어 친전자성의 AFB₁-2,3-epoxide로 전환되고 이것이 친핵성인 핵산(RNA, DNA)이나 단백질과 함께 부가 생성물을 형성함으로써 암 또는 변이를 유발시킨다고 알려져 있다(Heathcote 등, 1978).

육류 등 동물성 식품의 가열, 조리시 생성되는 대표적인 변이원 물질은 heterocyclic amine이다. Heterocyclic amine은 평면구조를 하고 있기 때문에 DNA의 염기쌍 사이로 끼어 들어가 세포돌연변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(Turesky, 1992). Okai 등(1993)은 아미노산의 가열 분해물 및 가열조리 식품으로부터 Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQx 및 PhiP 등을 동정하였으며, 돌연변이 시험계에서 *S. typhimurium* TA100 보다는 TA98에서 더 높은 변이원성을 보이며, 일부는 전형적인 발암 및 변이원물질인 aflatoxin B₁, 4-NQO, benzo[*a*]pyrene 등보다 더 강력한 변이원성을 나타냈다. 그리고 imidazoquinoline과 imidazoquinoxaline 유도체인 IQ, MeIQ, MeIQx는 A α C, MeA α C, PhIP, Trp-P-1보다 더 높은 변이원성을 보인다는 보고들이 있다(Sugimura 와 Sato, 1983; Sugimura 등, 1988).

3. 돌연변이원성 억제 효과

Nitrosamine의 생성억제에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데, Gary와 Dugan(1975)은 tocopherol, ascorbate 및 polyphenol 화합물을 사용하여 nitrosamine의 생성이 효과적으로 억제되었다고 보고하였다. Kato 등(1987)은 Maillard 반응 생성물인 melanoidin이 전구물질인 아질산염 분해능 및 nitrosamine 생성 억제능이 있다고 보고하였다. 그리고 유산균에 의한 nitrosamine과 아질산염의 소거에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Hosono, 1990; 오, 1997). 김 등(1999)은 대추잎 에탄올 추출물로부터 조제한 각 분획의 아질산염 소거작용은 1mg/ml의 낮은 농도에서도 모든 분획의 40% 이상의 소거를 나타내었고 농도가 증가하면서 소거율도 높았다고 보고하였으며, Nakamura와 Kawabata(1981)는 질산염과 제2급 아민과의 nitro화 반응시 녹차 추출물이 이에 대한 억제작용이 있었으며, polyphenol의 각 표준품인 pyrocatechol, pyrogallol, gallic acid는 nitrosamine 생성에 뚜렷한 저해효과를 보이지만, catechin에서는 오히려 촉진효과를 보이고, flavon, flavonol은 효과를 보이지 않았는데, 이 결과로서 녹차의 polyphenol 화합물이 제2급 아민과의 nitrosamine의 생성에 다양한 효과를 보인다고 하였다.

Shin 등(1989)은 된장이 AFB₁과 benzopyrene의 변이원성을 억제하는 효과가 있다고 보고한 바 있으며, 이 등(1992)은 녹황색 채소의 메탄올 추출물이 AFB₁에 대해 높은 변이원성을 나타내었다고 보고하였고, 이 등(1992)은 들깨잎의 메탄올 추출물에서 aflatoxin B₁에 대한 항변이 효과가 큰 phytol과 methyl 11,14,17-eicosatrienoate를 분리, 동정하였으며, Moon 등(1996)은 감잎의 chloroform 분획에서 aflatoxin B₁과 DMAB에 대해 항변이원성을 갖는 물질 9개를 분리하였고, 이 중에서 benzoic acid와 2,4-decadienal이 가장 효과가 높았다고 하였으며, 백 등(1988)은 인삼 saponin이 aflatoxin의 생성을 감소시키며, 생성된 aflatoxin에 대해 frame-shift mutant인 TA98에 대하여 saponin의 양이 증가함에 따라 돌연변이원성이 감소하였다고 보고하였다. 이외에도 마늘의 메탄올 추출물에 대한 각 분획물의 aflatoxin B₁에 대한 항

돌연변이 시험에서 chloroform의 분획물에서 가장 효과가 높았으며, 크로마토 그래피, GC-MS, NMR, FT-IR을 이용하여 분리, 동정된 화합물중 methyl linoleate가 다량 함유되었으며, 이 표준품의 항돌연변이 효과를 조사한 결과 효과가 매우 큰 것으로 보고하였다(Kim 등, 1991).

육류의 가열 조리시 생성되는 발암성 물질인 heterocyclic amine은 polyphenol(Fukuhara, 1981), Maillard 반응생성물(김 등, 1994), 해조 추출물(박 등, 1998, 박 등, 1998a; 박 등, 1998b) 등에 의해 억제된다는 보고들이 있으며, 식이섬유인 hemicellulose와 lignin도 heterocyclic amine 중의 하나인 IQ에 대해 항변이 효과가 있다는 보고가 있다(성, 1997). 송 등(1999)은 실제 음용조건으로 추출한 한국산 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물이 간접 변이원 물질 IQ에 대한 억제 효과가 탁월하였으나 직접 변이원 물질에 대해서는 저농도 첨가시에는 큰 변화가 없었다는 결과를 보고하였는데, 음용조건에서 추출한 차 추출물의 돌연변이 억제효과 기전은 차 추출물들이 변이원 물질과 직접 결합하여 돌연변이를 억제하기 보다는 돌연변이 물질의 체내 활성화 대사과정을 억제하는 물질로 작용하는 것으로 생각되어진다고 추정하였다.

Surono와 Hosono(1996)는 *S. typhimurium* TA98로부터 유도된 streptomycin 의존성 균주인 SD510를 사용하여 인도네시아의 고기와 작은새우의 paste로 만드는 염장품인 Terasi에서 돌연변이 유발력을 발견하였으며, 인도네시아의 유제품인 Dadih에서 분리해낸 유산균이 Terasi에 의해 유도되는 돌연변이를 억제하는 효과가 있었음을 보고하였다. Hosono 등(1990)은 유산균은 Trp-P-1, Trp-P-2에 대해서도 항돌연변이 효과가 있었으며, 유제품의 항변이원성은 유산균의 세포벽 성분과 결합된 물질의 하나일 가능성을 시사하였다.

4. 해조류의 생리활성 효과

해조류는 일반 야채류에 함유되어 있는 당류와는 다른 점질성 당류가 장의 활동을 원활하게 하고, 식염, 중금속 등의 배출, 콜레스테롤의 혈관 내 침착 방지 등에 효과가 매우 높다는 것이 밝혀졌고, 최근에는 해조류의 당류성분이 항암작용이 있음이 연구자들에 의해 밝혀지고 있으며(Cho 등, 1990; Lee 등, 1992), 이는 식이섬유가 식품 중의 변이원성 물질에 작용해서 체내의 흡수를 저하시키기 때문인 것으로 설명되고 있다(Hayatsu, 1991).

해조의 성분 조성을 보면 일반 성분중의 40~65% 정도가 탄수화물로서 이루어져 있고(Amano, 1991), 이들 탄수화물 대부분은 육상식물에서는 분포가 적은 독특한 구조로 이루어진 점질성 다당류이다(Mackie와 Preston, 1974). 이들 점질성 다당류는 생리활성작용이 있는 것으로 알려지고 있는데, 해조 다당류로는 갈조류에는 alginic acid, laminarin, mannitol 및 fucoidan 등이 있고, 홍조류에는 agar-agar, carrageenan, porphyran 등이 알려져 있다(도 등, 1997). 해조 다당류의 연구로는 추출조건에 따른 식이섬유의 함량에 관한 연구(도 등, 1997), 식이섬유로서의 영양상의 역할(Suzuki 등, 1993), 홍조 carrageenan의 항혈액 응고효과, 갈조 fucoidan의 제암효과(Yamamoto 등, 1981)와 항혈액응고작용(Church 등, 1989; 김 등, 1998), fucoidan의 화학적 특성(구 등, 1995) 등이 있다.

이 외에도 해조류에 함유되어 있는 방향환, 指環, 락톤환에 붙어 있는 물질, terpene 골격을 구성하는 물질, 페놀류, 직쇄 탄화수소 구조를 가지는 물질, 할로겐화 지방족, 황함유 화합물 등이 항균성이 있는 물질로 보고되고 있으며(藏多, 1979) 해조에 함유되어 있는 할로겐화 페놀중에서 구조가 밝혀진 것은 브롬화합물이며, 이 bromophenol류는 주로 홍조류에서 30여종이 분리, 동정되었다(Mautner 등 1953).

박 등(1998)은 갈조류의 일종인 곱피로부터 추출한 알긴산과 phenol 추출물, bromophenol, chlorophyll 및 그 유도체, carotenoid 성분 중 lutein 및 α -cryp-toxanthin이 PhIP 및 MeIQx에 대하여 변이원성 억제 작용이 있다

고 보고하였다. Cho 등(1990)은 각종 해조의 메탄올 추출물이 Ames계에서 시료량이 증가함에 따라 aflatoxin B₁과 MNNG에 의해 유도된 변이원성 및 암세포의 증식의 억제효과가 있다고 하였다. 또한 여러 연구자들에 의해 해조 열수추출물의 비여과 분획물이 쥐에 피하 주입한 sarcoma-180세포의 증식을 저해한다는 보고되었는데, 이 분획물의 주 구성요소는 다당류이고, 다당류에서 동정된 활성성분은 함황 glycuronoglycan이었다고 보고하였다 (Okai 등, 1993; Yamamoto 등, 1981, Yamamoto와 Maruyama, 1985). 미역 포자엽에서 추출한 알긴산이 인간의 암세포 증식을 저해하고, 또한 항변이 효과가 있다는 보고가 있다(Cho 등, 1998). 알긴산은 해조 식품의 점질성 식이섬유로 주성분은 uronic acid (manuronic acid와 guluronic acid)이고, 펙틴과 같은 성질을 갖으며, 알긴산의 항돌연변이원성과 항발암성은 homopolymer 1→4 linked β-D-manuronic acid(MM-block)와 α-L-guluronic acid (GG-block)의 조성에 달려있다(Fujihara와 Nagumo, 1993).



5. 툯의 돌연변이원성 억제효과

툯(*Hijikia fusiforme*)은 갈조식물(*Phaeophyta*)인 모자반과의 바다식물로서 식물체는 섬유상의 뿌리로 직립하며, 줄기는 원주상이고 1회 우상(羽狀)으로 가지가 갈라지는 해조류이다(조, 1988; 동아원색세계대백과사전, 1983).

툯은 제주도 연안에서 생육하고 있는 해조류 중 생산량(1996년 기준, 857톤)이 가장 높고 우뚝가사리와 함께 제주도 어촌계의 소득원의 주종을 이루고 있다(국립수산물검사소, 1996). 툯은 무기질 중 칼슘을 다량함유하고 있고, 식이섬유 특히 알긴산을 다량 함유하고 있는 저칼로리 식품으로서, 약리효과로 정장작용, 혈중 콜레스테롤 저하효과, 당뇨병 완화, 혈압강화 작용 등 성인병 예방효과가 알려지고 있다. 또한 기능성 물질인 fucoidan이 다량 함유되어 있고, 항변이 효과, 면역기능 증가작용, 항산화 작용이 있는 것으로

로 보고되고 있다(도 등, 1997; 오, 1997).

뜻에 대한 항변이원성에 대한 연구로는 大川과 鈴木(1993)의 각종 해조류의 변이원성 억제 효과에 대해 연구한 바에 의하면 갈조류 중 뜻의 열수출액과 불용성분획이 변이원 물질인 2-aminoanthracene, DNP, Trp-P-1, Trp-P-2 등에 대한 항변이원성을 연구하여 열수출액보다 불용성분획물이 더 높은 변이원성을 나타내었는데, 이는 해조의 식물섬유에 의한 효과일 것이라 추정하였다. 또한 김 등(1998)은 용매에 따른 뜻 추출물의 항변이원성을 연구하였다. Cho 등(1998)은 뜻 메탄올 추출물이 변이원성 물질인 aflatoxin B₁과 MNNG에 대해서 돌연변이 억제효과를 보이고, 암세포에 대해서도 증식 억제효과를 보고하였다. 이외에도 뜻을 이용한 건강 편의식품 개발에 관한 연구에서 뜻의 유효성분을 효과적으로 추출하기 위하여 용매별로 순차적으로 추출하여 항혈액응고활성과 항보체활성, 항산화활성, 항균활성 및 금속이온 결합능 등의 기능성을 측정한 보고(도 등, 1997; 김 등, 1996), 뜻 열수출물로부터 분리한 혈액 항응고성 다당류에 관한 연구(김 등, 1998)가 있다. Ryu 등(1989)은 뜻의 열수출물을 100mg/kg/day씩 쥐에 10일간 투여하였을 때 56.6%의 중앙 성장저지율을 보인다 하였고, Lee 등(1992)은 Sarcoma-180 세포를 이식한 흰쥐의 고형암 성장을 저지하는 효과를 보고하였다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험재료

툇은 남제주군 남원읍 위미2리 어촌계에서 건조된 것을 구입하여 수돗물로 2~3회 씻어 염분과 불순물을 제거하고, 60℃에서 열풍 건조시킨 다음 건식분쇄기로 분쇄하여 추출용 시료로 하였다.

2. 시료의 추출

분쇄한 건툇 1kg에 methanol 3 l 를 가하여 45℃에서 각각 3시간과 12시간 동안 추출하였다. 이것을 감압, 농축하여 메탄올을 제거하고, 증류수로 이행시켜 동결건조하였다. 동결건조된 분말에 물을 가하여 용해시키고, 나머지 잔사물은 극성이 낮은 유기용매인 hexane, chloroform, ethyl acetate를 가하여 순차적으로 분획하였다(Fig. 1). 이들 순차분획물을 감압, 농축한 후 dimethylsulfoxide(DMSO)로 100ml 정용하여 항변이원성 시험에 사용하였다.

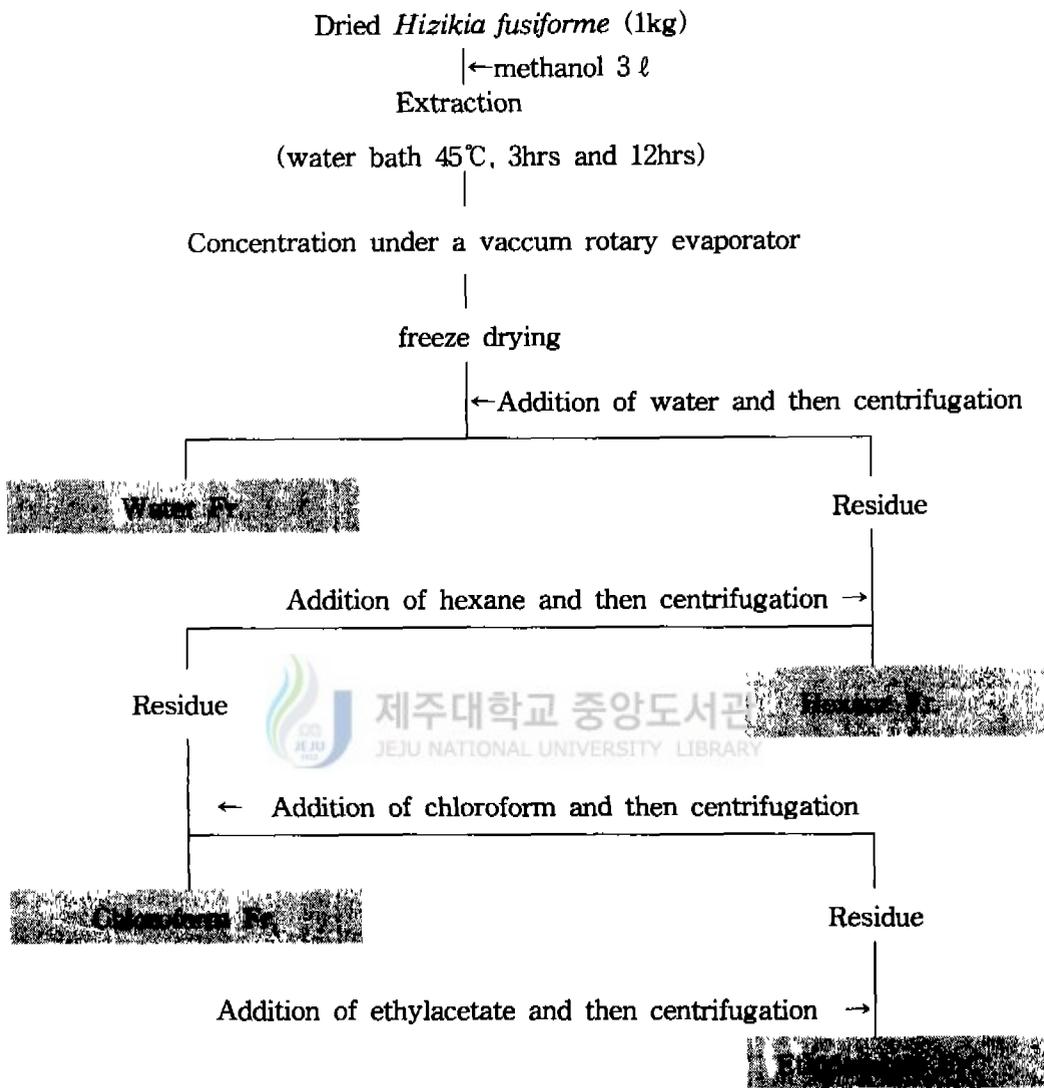


Fig. 1. Scheme for fractionation of methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

3. 항변이원성의 검색

1) 표준돌연변이원

표준 변이원 물질은 4-nitroquinoline-*N*-oxide(4-NQO, Aldrich사), 4-nitro-*o*-phenylenediamine(NPD, Aldrich사), 2-methoxy-chloro-9-(3-(2-chloroethyl)aminopropylamino)acridine(ICR191, Sigma사)을 사용하였다.

2) 지표균주

본 연구를 수행하기 위하여 4종류의 지표균주를 사용하였다. 시험균주는 *S. typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph)인 TA97, TA98, TA100 및 TA102를 사용하였으며, 실험에 사용된 지표균주의 유전자 구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Genotype of the *S. typhimurium* TA strains used for mutagens testing

Strain	Histidine mutation	LPS	Repair	R-factor
TA97	hisD6610	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+R
TA98	hisD3052	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+R
TA100	hisG46	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+R
TA102	hisG428(pAQ1)	<i>rfa</i>	+	+R

All strains were originally derived from *S. 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 *rfa* mutation eliminate the peolysaccharide side chain of the LPS that coats the bacterial surface. from Ames et al(1983).

3) 균주의 동정

(1) Histidine과 biotin 요구성

검정균주들의 histidine을 합성하지 못하는 형질은 선택 agar plates에서 성장하는 동안 histidine 요구성을 확인함으로써 확인되었다. TA102를 제외한 모든 표준검정균주들은 bio 유전자를 통해 확장된 *uvrB* 결시 균주이므로 biotin을 요구한다. 각각의 plate는 0.1M L-histidine 0.1ml와 0.5mM biotin 0.1ml를 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(*rfa*) 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 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 흡수시킨 뒤 균이 접종된 nutrient agar상에 떨어뜨리고 37℃에서 12시간 배양하였다. Deep rough형은 crystal violet의 독성 작용으로 균주가 사멸하기 때문에 disc 주위에 저해 지역이 생성되나 야생형(wild type) 균주는 저해지역이 나타나지 않는다. Deep rough 균주는 대략 14mm 정도의 저해지역이 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℃에서 12~14시간 배양하였다. *UvrB* 돌연변이 균주는 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 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.

4) 균주의 보관 및 배양

(1) 냉동보존

실험 균주의 보관은 Ames와 McCann(1982)의 방법에 따라 frozen permanent를 제조하여 -80°C 의 초저온 냉동고에 보관하였다. Ames로부터 제공받은 TA97, TA98, TA00 및 TA102를 oxid broth에서 37°C incubator에서 10시간 배양한 후 멸균된 DMSO 용액을 배양액 1ml당 $90\mu\text{l}$ 를 가하고 완전히 혼합한 후 멸균된 2ml의 eppendorf tube에 분주하여 -80°C 냉동고에서 급속 동결하였다.

(2) Master plate의 제조

매 실험 직전, 자연 복귀돌연변이(spontaneous revertant) 수가 정상에서 벗어날 경우, 유전 형질을 잃어버린 경우 및 표준돌연변이원에 대한 민감성이 떨어질 때 frozen permanent로부터 배양액을 꺼내 master plate를 제조하였다. 냉동 보관 균주를 1개씩 실온에 녹인 후 멸균된 백금으로 단일 colony를 분리하여 TA97, TA98 및 TA100은 ampicillin plate상에 도말하여 37°C 에서 48시간 배양하고, TA102는 ampicillin/tetracycline plate에 도말 배양한 후 단일 colony를 백금으로 취하여 액체배양액에서 다시 배양하여 ampicillin plate 또는 ampicillin/tetracycline plate 위에 백금으로 그은 후 37°C 에서 12시간 배양하여 4°C 의 냉장고에 보관하였다.

(3) 시험균주의 전 배양

Difco nutrient broth 12.5g을 증류수 500ml에 용해하여 고압멸균기에서 121℃, 20분간 멸균한 뒤 멸균된 glass test tube에 10ml씩 분주하였다. 여기에 master plate에서 배양된 시험균주를 각각 1 백금이 접종한 후 37℃ 진탕배양기에서 7~10시간 배양하였다. 배양시간에 따른 흡광도가 0.25~0.30이 되었을 때 실험에 사용하였다. 또한 생육시간은 12시간을 초과하지 않도록 하였다.

5) 표준돌연변이원의 dose-response

건초의 메탄올 추출물 및 그 분획물의 변이원성 실험은 *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102를 이용하여 Maron과 Ames(1983)의 표준평판 배지법에 따라 실시하였다. 변이원성 시험에는 표준 변이원물질인 4-NQO, NPD 그리고 ICR191를 사용하였다.

각 농도별 발암물질을 미리 멸균시킨 glass cap tube에 각각 100 μ l씩 가하고 여기에 배양된 균주 100 μ l를 가한 다음 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μ l가 되도록 하였다. 이것을 histidine/biotin이 첨가된 top agar에 2ml씩 가하여 골고루 퍼지도록한 후 미리 준비해 둔 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켰다. 고화된 plate는 37℃에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(*his*⁺ revertant colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

6) Spot test

미리 조제된 minimal glucose agar plate 상에 멸균된 glass cap tube에 균주를 100 μ l, histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2ml를 가하여 잘 혼합한 후 plate상에 도말하여 고화시킨 후 멸균된 disc 여지를 멸균 핀셋으로 정중앙에 놓아 살짝 눌러주고, 각각의 농도별 변이원물질을 60 μ l씩 마이크로 피펫으로 취한 뒤 disc 여지에 살짝 떨어뜨렸다. 이것을 37℃에서 48시간 배

양하여 균주의 성장이 유도되는지 혹은 저해가 되는지를 확인하였다.

7) 항변이원성 시험

항변이원성 시험을 위해 표준 변이원 물질인 4-NQO, NPD 및 ICR191을 사용하였다. 각 시료를 미리 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50 μ l, 100 μ l씩 가하고 여기에 배양된 균주 100 μ l를 가한 다음 변이원 물질을 각각 100 μ l씩 가하고, 0.2M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μ l가 되도록 하였다. 이것을 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 수를 측정하여 항변이원성 유무를 판정하였다. 항변이 활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(%)로 나타내었다.

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

4. HPLC에 의한 항돌연변이원성 물질의 분리

1) 시료의 전처리

계통적 추출법에 의해 극성이 낮은 용매인 hexane부터 chloroform, ethyl acetate 순서로 추출하였다. 추출된 분획물을 감압, 농축하여 메탄올에 녹여 membrane filter(0.45 μ m, Millipore Co., USA)로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

2) 검출파장

Spectrophotometer(Hewlett Packard 8453)로 scanning하여 흡광도가 높은 파장을 선택하였다.

3) 이동상

이동상은 methanol과 3차 증류수를 각각 0~100%, 100~0%로 조정하면

서 유속은 1.0ml/min, 표준액 10 μ l 주입하여 분석하였다.

5. 분리된 물질의 항돌연변이 효과 재검정

Hexane 분획물(3hr)을 HPLC로 분리해낸 각 peak 중 함량이 가장 많은 RT 2.40인 물질에 대해서 항변이 효과를 검정하였다. 사용균주는 TA97, TA98, TA100 및 TA102를 사용하였고, 시료의량은 plate 당 각각 50 및 100 μ l를 첨가하였다.



IV. 결과 및 고찰

1. 추출수율

건조된 톳에서 추출한 methanol 및 각 순차분획물의 추출수율은 Table 2와 같다. 1kg의 건톳에 대하여 45℃에서 3시간 추출한 메탄올 추출물은 17.00g, 12시간 추출한 메탄올 추출물은 35.67g을 얻었으며 추출수율은 각각 1.70%, 3.57% 이었다. methanol 추출물에 대한 증류수, hexane, chloroform, ethylacetate의 추출수율은 3시간 추출물인 경우 각각 1.17%, 0.24%, 0.03%, 0.07% 였고, 12시간 추출물은 각각 1.14%, 1.94%, 0.10%, 0.04%였다. 결과로서 추출수율은 시간증가에 의한 효과를 나타내었으며, 대부분 극성이 높은 증류수에 용해되었지만 나머지 잔사물은 극성이 낮은 n-hexane에 대부분 용해되었고, 특히 12시간 추출한 경우는 증류수에 용해된 물질의 수율은 변화가 거의 없지만 n-hexane에 보다 많은 물질이 용해되었다.

Table 2. Extractions yield of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*) by various solvents.

Fraction	3hrs extracted		12hrs extracted	
	Dried weight(g)	Yield(%)	Dried weight(g)	Yield(%)
*Methanol	17.0	1.70	35.7	3.57
Aqueous	11.7	1.17	11.4	1.14
n-Hexane	2.40	0.24	19.4	1.94
Chloroform	0.70	0.07	1.00	0.10
Ethylacetate	0.30	0.03	0.40	0.04

* Methanol extract was fractionated into four fraction

$$Yield(\%) = \frac{\text{dried weight of extract fraction}(g)}{\text{dried Hizikia fusiforme}(kg)} \times 100$$

2. 표준돌연변이원의 dose-response

4-NQO는 염기치환성 돌연변이원으로 TA100과 TA102를 이용한 돌연변이 검정시 양성반응물질로, ICR191은 구조이동성 돌연변이원으로 TA97를 이용한 돌연변이 검정시에, NPD는 구조이동성 돌연변이원 TA98과 염기치환성 돌연변이원 TA100을 이용한 돌연변이 검정에 이용되고 있다(Maron 과 Ames, 1983). 돌연변이원은 농도에 따른 revertant colony 수가 다르기 때문에 최대 저지환을 형성하기 직전의 돌연변이원의 양, 즉 최적농도를 결정하는 것이 중요하기 때문에 plate test와 spot test를 병행하여 최적농도를 결정하였다.

표준돌연변이원의 dose-response 결과 ICR191는 TA97에서 plate 당 $2.5\mu\text{g}$ 에서 revertants colony 수가 2,164로 높은 돌연변이 활성을 보이며, 그 이상의 농도에서 완만한 곡선을 보이며, plate 당 $2.5\mu\text{g}$ 이하에서는 직선적인 돌연변이 활성을 보이고 있다. 그러나 spot test에서는 $2.5\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상의 농도에서는 ICR191의 균주에 대한 세포독성으로 인하여 저해존을 형성하므로 시험에 적합한 농도를 colony counting이 용이하고 저해존을 형성하지 않는 plate 당 $1.25\mu\text{g}$ 의 투여농도를 선택하였다.

표준돌연변이원 NPD에 대한 시험균주 TA98과 TA100에 대한 dose-response는 Fig. 4에 나타내었다. TA98에 대한 NPD의 복귀돌연변이 수는 plate당 $100\mu\text{g}$ 의 투여농도 까지 직선적인 증가량을 보이고 있지만, Fig. 5와 6에서의 spot test에서 TA98은 $50\mu\text{g}/\text{plate}$ 이상의 농도에서 저해존을 형성하므로 두 시험법에 의해 최적농도를 plate당 $25\mu\text{g}$ 으로 하였고, TA100인 경우는 투여 농도가 plate 당 $50\mu\text{g}$ 까지는 revertant colony가 최고치였으나 그 이상의 투여농도에서는 균주에 대한 독성 작용으로 인한 감소 추세를 보이고 있다. 그리고 spot test에서는 plate당 $100\mu\text{g}$ 을 초과하는 농도에서는 균주의 세포 독성작용에 의해 저해존을 형성하였다. 따라서 두 방법을 병행한 결과로 TA100에 대한 변이원 물질인 NPD의 dose-response의 농도를 plate당 $50\mu\text{g}$ 로 결정 하였다.

4NQO에 대한 시험균주 TA100과 TA102의 dose-response는 Fig. 7에 나타내었다. TA100인 경우는 4-NQO가 plate당 0.1 μ g까지는 복귀돌연변이 수가 직선적인 증가 추세를 보이거나, 0.1 μ g에서 0.5 μ g사이에는 완만한 증가를 보이다 복귀돌연변이 수가 감소하는 추세를 보였다. 이는 농도의 증가에 따른 균주의 독성작용의 영향으로 보인다. spot test에서도 0.2 μ g/plate 이상의 투여에서는 저해존을 형성하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 이 두가지를 병행한 최적 dose-response조건을 plate당 0.1 μ g을 선택하였다. TA102에 대한 4-NQO의 dose-response는 직선적인 증가를 보이며 0.2 μ g/plate에서 복귀돌연변이 수가 1,150에 이르며 그 이상의 농도에서는 2,000이 훨씬 넘는 colony를 보였다. spot test에서는 돌연변이 plate당 0.5 μ g이상의 농도에서 저해존을 형성하였고, 결국 counting이 용이하고 spot test에서 저해존을 형성하지 않는 범위인 0.2 μ g/plate을 선택하였다.



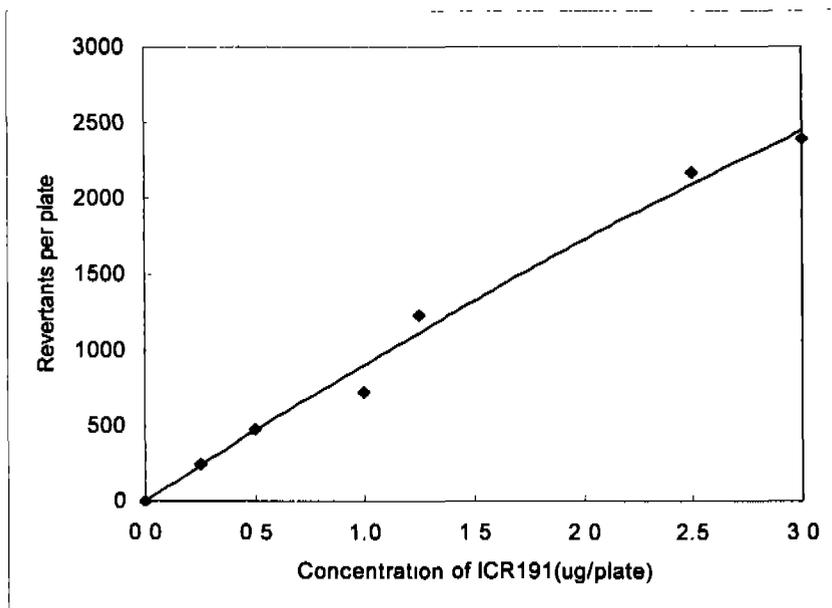


Fig. 2. Dose-response of *S. typhimurium* TA 97 to ICR191
(Spontaneous revertants are subtracted)

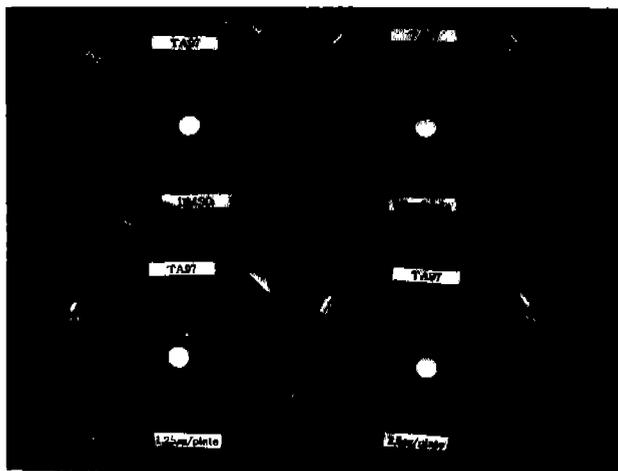


Fig. 3. Spot test of *S. typhimurium* TA97 for ICR191.

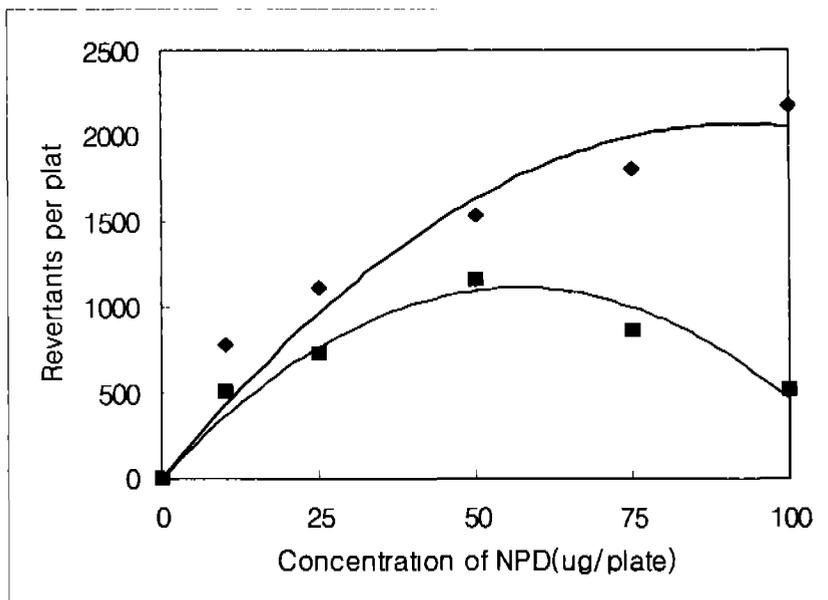


Fig. 4. Dose-response of *S. typhimurium* TA strains to NPD
(Spontaneous revertants are subtracted)

◆ TA98, ■ TA100



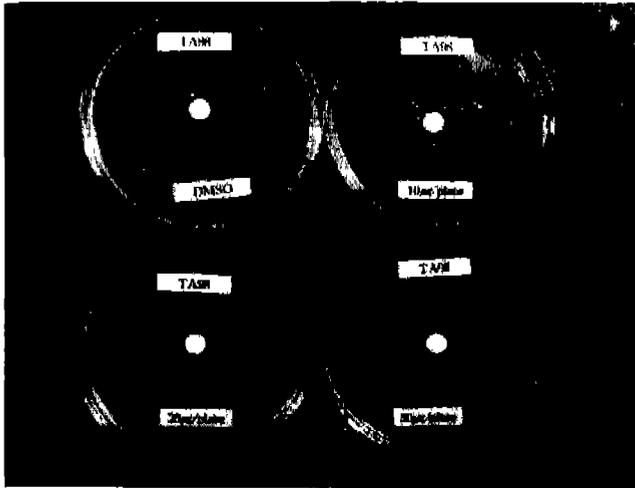


Fig. 5. Spot test of *S. typhimurium* TA98 for NPD.



Fig. 6. Spot test of *S. typhimurium* TA100 for NPD.

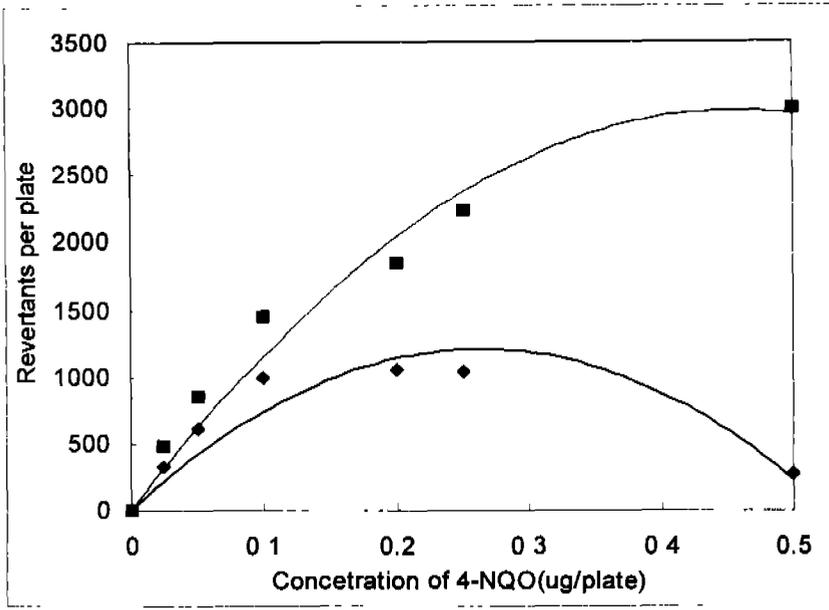


Fig. 7. Dose-response of *S. typhimurium* TA strains to 4-NQO.

(Spontaneous revertants are subtracted)

◆ TA100, ■ TA102





Fig. 8. Spot test of *S. typhimurium* TA100 for 4-NQO.

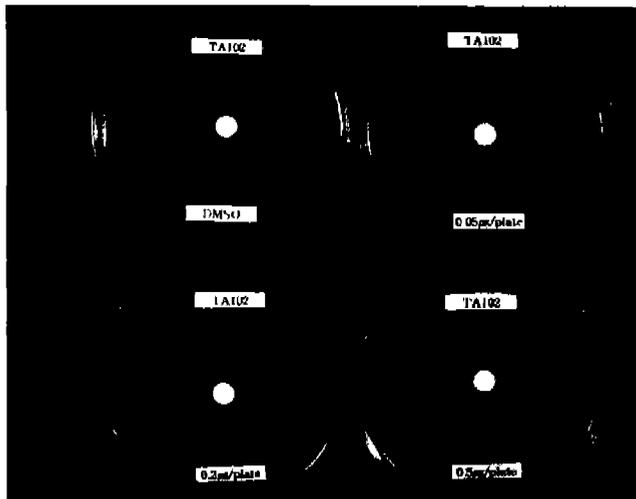


Fig. 9. Spot test of *S. typhimurium* TA102 for 4NQO.

3. 항돌연변이원성 효과

1) 톳 메탄을 분획물의 돌연변이원성

톳 메탄을 분획물의 *S. typhimurium* 균주에 대한 돌연변이원성 시험 결과는 Table 3, 4와 같다. 시료에 대한 돌연변이 시험의 목적은 시료 자체의 돌연변이원성을 확인하고, 시료농도의 증가량에 따른 균주에 대한 세포독성 효과, 혹은 항돌연변이 효과를 확인하여 항돌연변이 시험에 적합한 농도를 확인하기 위해 실시하였다. 각 용매의 추출물들의 농도를 각각 plate당 50~200 μ g를 첨가하였을 때 건 톳 3시간 추출물에 대한 순차 분획물의 돌연변이 시험 결과 수용성 분획물인 경우 첨가량이 증가하면서 모든 균주의 negative control의 영역 보다 다소 높은 복귀돌연변이를 보였는데, 이는 수용성 분획물중에 돌연변이 유발성 물질이 함유되어 있을 거라 추정되며, 유기용매 분획물에서는 농도가 증가함에 따라 복귀 돌연변이의 수가 감소하는 추세를 보이고 있는데, 이는 시료량의 증가가 균주에 대한 세포독성작용이나 돌연변이 억제에 영향을 미치고 있다고 생각된다. 따라서, 항돌연변이 시험에 적합한 농도를 균주에 대한 세포 독성효과가 미치지 않는 plate 당 100 μ g이하의 농도에서 실시하였다.

건 톳 12시간 메탄을 추출물에 대한 순차분획물의 돌연변이 시험에서도 3시간 추출물과 같이 수용성 분획물인 경우는 negative control보다 다소 높은 돌연변이수를 보였고, 유기용매 분획물에서는 시료량이 증가하면서 균주에 대한 세포독성작용으로 복귀돌연변이수가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이 돌연변이 시험 결과로서 시료량이 균주에 영향을 주지않는 농도 범위인 plate당 100 μ g이하에서 항돌연변이 시험을 실시하였다.

Table 3. Mutagenic activity of fractions obtained from 3hr-methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

Fractions	Amount of extract (μ /plate)	Revertants per plate			
		TA97	TA98	TA100	TA102
Negative control		71 \pm 6	13 \pm 2	94 \pm 5	164 \pm 7
Water	50	110 \pm 5	18 \pm 8	102 \pm 11	168 \pm 12
	100	117 \pm 2	28 \pm 6	119 \pm 8	215 \pm 8
	200	141 \pm 2	21 \pm 8	170 \pm 11	255 \pm 5
n-Hexan	50	65 \pm 4	11 \pm 2	88 \pm 8	156 \pm 12
	100	51 \pm 6	9 \pm 2	82 \pm 7	140 \pm 11
	200	5 \pm 2	0 \pm 0	62 \pm 7	85 \pm 8
Chloroform	50	75 \pm 3	8 \pm 2	101 \pm 10	167 \pm 10
	100	62 \pm 2	10 \pm 2	88 \pm 6	158 \pm 4
	200	3 \pm 1	0 \pm 0	78 \pm 8	99 \pm 2
Ethylacetate	50	77 \pm 1	11 \pm 2	84 \pm 3	174 \pm 10
	100	66 \pm 3	17 \pm 4	94 \pm 8	161 \pm 4
	200	56 \pm 1	10 \pm 3	90 \pm 10	163 \pm 4

Each value represents the mean \pm S.D. of four plates.

Negative control : 100 μ l of DMSO per plate was added instead of extract fraction.

Table 4. Mutagenic activity of each fraction obtained from 12hr-methanol extracts fo *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

Fractions	Amount of extract (μ l/plate)	Revertants per plate			
		TA97	TA98	TA100	TA102
Negative control		71 \pm 6	13 \pm 3	94 \pm 5	164 \pm 7
Water	50	88 \pm 10	13 \pm 2	120 \pm 13	211 \pm 10
	100	98 \pm 5	28 \pm 4	110 \pm 8	223 \pm 4
	200	103 \pm 9	134 \pm 11	135 \pm 15	239 \pm 15
n-Hexan	50	67 \pm 7	9 \pm 2	90 \pm 7	177 \pm 18
	100	47 \pm 4	10 \pm 4	87 \pm 4	138 \pm 6
	200	35 \pm 9	2 \pm 1	25 \pm 6	100 \pm 12
Chloroform	50	88 \pm 9	14 \pm 1	90 \pm 2	161 \pm 6
	100	58 \pm 3	11 \pm 2	75 \pm 5	154 \pm 12
	200	37 \pm 3	0 \pm 0	0 \pm 0	140 \pm 3
Ethylacetate	50	75 \pm 12	10 \pm 2	99 \pm 10	192 \pm 11
	100	69 \pm 8	11 \pm 4	100 \pm 5	188 \pm 6
	200	76 \pm 2	5 \pm 1	78 \pm 11	152 \pm 2

Each value represents the mean \pm S.D. of four plates.

Negative control : 100 μ l of DMSO per plate was added instead of extract fraction.

2) 톳 메탄을 분획물의 항돌연변이원성

톳의 용매별 분획물의 돌연변이원성 억제작용을 검토한 결과는 Table 5~9에 나타내었다. Table. 5는 ICR191에 의해 유도된 돌연변이에 대한 톳 추출물의 항돌연변이 시험결과이다. ICR191은 반응기가 DNA의 guanine의 7-N 위치에 결합해서 독성을 나타내는 acridine 유도체로서(Levin 등, 1982) 구조이동성 돌연변이원 검정균주인 *S. typhimurium* TA97에 대한 양성변이원 물질로 이용되고 있다(Maron과 Ames, 1983). Table. 5에서 보는 바와 같이 수용성 분획물에 비해 유기용매에 의한 분획물의 항돌연변이 효과가 높았으며, 분획물의 첨가량이 증가하면서 돌연변이 억제효과도 높은 결과를 보여주고 있다. 추출시간에 의한 효과는 유기용매 분획물에서는 큰 차이를 보이고 있지는 않지만, 수용성 추출물에서는 추출시간이 12시간 보다는 3시간 추출시간에서 더 높은 항돌연변이 억제 효과를 보여주고 있으며, 유기용매 분획물과는 달리 첨가량이 증가하면서 오히려 항돌연변이 억제 효과가 다소 낮아지는 결과를 보여주었다. 12시간 추출을 하였을때의 수용성 분획물은 plate당 100 μ l를 투여했을 때 복귀 돌연변이 수를 증가시키는 경향을 보여주었다. 유기용매 분획물에서는 극성이 가장 낮은 hexane 분획물에서 가장 높은 효과를 보이고 있는데, plate당 100 μ l를 투여했을 때 추출시간에 상관없이 97%이상의 억제효과를 보여주고 있다. 그리고 ethyl acetate 분획물에서도 plate당 100 μ l를 첨가했을 때 각각의 추출시간에 따라 69%, 66%의 돌연변이 억제효과를 보여주고 있는데, 이는 고형함량에 비해 상당히 높은 억제효과를 보여주고 있다. 이는 동일 분획물 양으로 비교된 것이 아니라, 같은 양의 추출시료에서 순차적으로 추출된 분획물에 대한 비교로서, 이들간의 항돌연변이원성이 높고 낮음을 서로 비교하는 것은 무리인 듯 하다. 전체 메탄을 분획물의 항돌연변이 효과는 3시간 추출물에서 plate당 100 μ l를 투여했을 때 96%의 항돌연변이 효과를 보이고, 12시간 추출물에서는 83%의 항돌연변이 효과를 보였다. 이는 상당히 높은 항돌연변이 활성을 보여주었으나, hexane 분획물에서 보인 항돌연변이 효과보다는 다소 낮은 결과를 보였다.

Table 5. Antimutagenic effects on ICR191-induced mutation of fractions obtained from methanol extract of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

Extracts	Amount of extract (μ l/plate)	Revertants per plate	
		<i>S. typhimurium</i> TA97	
		3hr	12hr
Positive control		1,136	
Methanol	50	110 \pm 60(-90)	270 \pm 35(-76)
	100	50 \pm 20(-96)	197 \pm 39(-83)
Water	50	592 \pm 60(-48)	1,280 \pm 60(+13)
	100	502 \pm 94(-56)	1,125 \pm 25(-10)
n-Hexane	50	95 \pm 30(-92)	136 \pm 10(-88)
	100	18 \pm 9(-98)	32 \pm 9(-97)
Fr. Chloroform	50	443 \pm 45(-61)	368 \pm 24(-68)
	100	173 \pm 40(-85)	246 \pm 40(-78)
Ethylacetate	50	539 \pm 23(-53)	675 \pm 98(-41)
	100	350 \pm 40(-69)	387 \pm 50(-66)

The amount of ICR191 used was 1.25 μ g per plate. Spontaneous revertants (negative control) are subtracted. Negative control: DMSO was added instead of sample

Fr.: Fraction; (): Inhibition rate; +, acceleration; -, inhibition

Methanol extract was fractionated into four fraction.

Table 6은 *S. typhimurium* TA98에 대해서 직접변이원인 NPD에 의해 유도된 복귀돌연변이에 대한 각 분획물의 항돌연변이 효과를 나타낸 것이다. 수용성 분획물에 비해 유기용매 분획물에 의한 항돌연변이 효과가 높았으며, 순차분획물 중에서 hexane분획물이 항돌연변이 효과가 높게 나왔다. 추출시간에 대한 차이는 유기용매 분획물에서는 차이가 미미하였지만, 수용성 분획물에서는 3시간 추출하여 얻은 분획물에서 보다 높은 효과를 보여주었

다. 그리고 유기용매 분획물의 첨가량이 증가하면서 항돌연변이 효과도 증가하는 경향을 보여주고 있다. 전체 methanol 추출물에 대한 항돌연변이 효과는 3시간, 12시간 추출물에서 plate 당 100 μ g 투여시 각각 92%의 효과를 보여주었고, 50 μ g 투여시에서는 각각 78와 84%의 효과를 보였다.

Table 6. Antimutagenic effects on NPD-induced mutation of fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

Extracts	Amount of extract (μ g/plate)	Revertants per plate	
		<i>S. typhimurium</i> TA98	His ⁺
Positive control		1,456	
Methanol	50	320 \pm 13(-78)	227 \pm 21(-84)
	100	107 \pm 18(-92)	110 \pm 9(-92)
Water	50	708 \pm 45(-37)	1,383 \pm 36(-5)
	100	720 \pm 50(-36)	1354 \pm 50(-4)
n-Hexan	50	349 \pm 51(-76)	800 \pm 56(-45)
	100	168 \pm 23(-85)	43 \pm 19(-97)
Fr. Chloroform	50	509 \pm 18(-65)	524 \pm 20(-64)
	100	407 \pm 28(-72)	291 \pm 46(-80)
Ethylacetate	50	931 \pm 65(-36)	873 \pm 7(-40)
	100	728 \pm 86(-50)	698 \pm 21(-52)

The amount of NPD used was 25 μ g per plate. Spontaneous revertants (negative control) are subtracted. Negative control: DMSO was added instead of sample

Fr.: fraction; (): Inhibition rate; -, inhibition

Methanol extract was fractionated into four fraction.

Table 7은 *S. typhimurium* TA100 균주를 사용하여 25 μ g/plate의 NPD에 의해 유도되는 돌연변이원성에 대한 각 분획물의 항돌연변이 효과 결과이다. 역시 hexane 분획물에서 항돌연변이 효과가 높았으며, 수용성 추출물에서는 3시간 추출한 분획물을 100 μ l/plate로 투여했을 때 40%의 항돌연변이 효과를 보인 반면, hexane 및 chloroform 분획물의 100 μ l/plate 투여에서는 97%의 강한 항돌연변이원성을 보이고 있어 염기치환성 돌연변이에 강한 억제 작용을 하고있다고 알 수 있다. 그리고 투여농도를 두배 차이로 첨가했을때의 항돌연변이 효과는 상당한 차이를 보여주고 있다.

Table 7. Antimutagenic effects on NPD-induced mutation of fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*)

Extracts	Concentration (μ l)	Number of revertants	% of control
Positive control			
Methanol	50	360 \pm 23(-51)	240 \pm 10(-67)
	100	121 \pm 16(-83)	64 \pm 9(-91)
Aqueous	50	659 \pm 17(-10)	754 \pm 7(+3)
	100	437 \pm 7(-40)	527 \pm 36(-28)
Fr. n-Hexan	50	601 \pm 29(-18)	388 \pm 65(-47)
	100	21 \pm 8(-97)	21 \pm 7(-97)
Fr. Chloroform	50	461 \pm 26(-37)	564 \pm 14(-23)
	100	0 (-100)	95 \pm 15(-87)
Fr. Ethylacetate	50	520 \pm 52(-29)	652 \pm 14(-11)
	100	202 \pm 17(-72)	366 \pm 7(-50)

The amount of NPD used was 25 μ g per plate. Spontaneous revertants (negative control) are subtracted. Negative control: DMSO was added instead of sample.

Fr.: fraction; (): Inhibition rate; +, acceleration; -, inhibition

Methanol extract was fractionated into four fraction.

Table 8은 시험균주 TA100에 의해 유도된 4NQO의 복귀돌연변이에 대한 각 분획물의 항돌연변이 억제 효과의 결과이다. 전체적으로 각 분획물은 염기치환 돌연변이에 대해서 상당히 높은 억제효과를 가지고 있다. 수용성 추출물에서도 plate당 $100\mu\text{l}$ 를 투여했을 때 각각의 추출시간에 따른 분획물에 대해 69%, 53%의 억제효과를 보이고 있으며, 특히 3시간 추출물에 대한 hexane과 chloroform 분획물에 대해서는 변이원 물질에 유도된 모든 복귀돌연변이를 80% 이상의 높은 억제 효과를 보여주고 있다. 추출시간에 따른 각 분획물의 항돌연변이 효과는 유기용매 분획물에서는 그다지 차이를 보이지 않고 있지만 수용성 분획물에서는 12시간 추출물 보다 3시간 추출물이 수용성 분획물에서는 더 높은 항돌연변이 효과를 보이고 있는데, 이는 장시간을 추출하면서 변이원성을 억제하는 수용성 성분이 소실된 것이라 추정된다.

Table 8. Antimutagenic effects on 4NQO-induced mutation of fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

Extracts	Amount of extract (μ l/plate)	Revertants per plate	
		<i>S. typhimurium</i> TA100	
		3hr	12hr
		methanol extract	methanol extract
Positive control		1,095	
Methanol	50	73 \pm 8(-93)	60 \pm 10(95)
	100	32 \pm 4(-97)	0 (-100)
Water	50	551 \pm 50(-50)	1,051 \pm 32(-4)
	100	342 \pm 9(-69)	514 \pm 12(-53)
Fr. n-Hexan	50	164 \pm 49(-85)	186 \pm 65(-83)
	100	0 (-100)	0 (-100)
Fr. Chloroform	50	142 \pm 34(-87)	307 \pm 54(-72)
	100	0 (-100)	0 (-100)
Fr. Ethylacetate	50	229 \pm 33(-79)	503 \pm 54(-54)
	100	142 \pm 10(-87)	175 \pm 22(-84)

The amount of 4NQO used was 0.1 μ g per plate. Spontaneous revertants (negative control) are subtracted. Negative control: DMSO was added instead of sample.
Fr.: fraction; -, inhibition

Table 9는 염기치환성 돌연변이 검정에 이용되는 *S. typhimurium* TA102를 이용한 항돌연변이 시험 결과이다. 수용성 분획물에 대해서는 12시간 추출물 보다 3시간 추출물이 더 높은 항돌연변이 효과를 보이고 있으나, 투여 농도와는 큰 차이를 보이고 있지는 않았다. 유기용매 분획물에 대한 항돌연변이 효과는 대체로 비슷한 효과를 보이고 있지만 특히 hexane 분획물에 대해서 더 높은 항돌연변이 효과를 보였으며, plate 당 100 μ l을 투여 했을 때, 각각 83%와 96%의 항돌연변이 효과를 보여주고 있다.

Table 9. Antimutagenic effects on 4NQO-induced mutation of fraction obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

Extracts	Amount of extract (μ l/plate)	Revertants per plate	
		<i>S. typhimurium</i> TA102	1802
Positive control		1,150	
Methanol	50	230 \pm 12(-80)	391 \pm 23(-66)
	100	138 \pm 23(-88)	299 \pm 46(-74)
Aqueous	50	876 \pm 23(-24)	1,130 \pm 29(-2)
	100	641 \pm 35(-44)	1,127 \pm 33(-2)
n-Hexan	50	368 \pm 69(-68)	414 \pm 29(-64)
	100	195 \pm 57(-83)	46 \pm 23(-96)
Fr. Chloroform	50	483 \pm 21(-58)	690 \pm 54(-40)
	100	287 \pm 59(-75)	322 \pm 23(-72)
Ethylacetate	50	805 \pm 18(-30)	632 \pm 48(-45)
	100	253 \pm 49(-78)	575 \pm 57(-50)

The amount of 4NQO used was 0.2 μ g per plate. Spontaneous revertants (negative control) are subtracted. Negative control: DMSO was added instead of sample.
Fr.: fraction; -, inhibition

각 변이원에 대한 순차분획물의 항돌연변이 효과는 유기용매 분획물에 의한 효과가 높게 나타났고, 투여 농도가 증가하면서 변이원 억제효과가 높게 나타났으며, 특히 hexane 분획물에서 높은 효과를 보여주었다. 大川과 鈴木(1993)은 건조 톳의 물 추출물을 수용성 분획과 불용성 분획으로 분리하여 항돌연변이를 시험한 결과 불용성 분획에서 강한 항돌연변이 효과가 있다고 하였으며, 박 등(1998a)은 톳 메탄올 추출물을 diethyl ether, 증류수, chloroform 및 ethyl acetate로 순차적으로 추출한 분획물을 가지고 발암성 물질인 PhIP와 MeIQx의 돌연변이원성 억제 수용성 추출물보다는 비극성획

분에 의한 항돌연변이 효과가 높게 나타났다고 하였다.

상기의 결과에 따라서 톳 추출물의 항변이원성 효과는 비극성 획분에서 항돌연변이 효과가 높은 것으로 알려지고 본 연구에서는 비극성 획분 중 n-hexane에서 가장 높은 항돌연변이 활성을 보여 이 분획물에 대한 보다 구체적인 분석이 요구되어 진다.

4. 항돌연변이 물질의 분리

각 변이원성 물질에 대한 분획물의 항돌연변이 효과 중 가장 효과가 높은 hexane 분획물(3hr)을 가지고 항돌연변이 효과를 보이는 성분 구명을 위해 HPLC로 hexane 분획물의 성분을 분리, 정제하여 항돌연변이 효과가 있는지 확인하였다.

1) 검출파장 선택

hexane 분획물인 경우 흡광도 측정결과 200~250nm의 파장 범위에서 높은 흡수 파장을 보였으며, $216 \pm 5\text{nm}$ 에서는 극대흡수(λ_{max})를 나타내었다(Fig. 10). 그리고 hexane, chloroform, ethylacetate의 분획물에 대한 최대흡수 파장 범위는 Fig. 11에 나타내었다. 각 분획물의 분리를 위한 최적 흡수파장은 200~250nm에서 각각 실험한 결과 225nm에서 각 구성성분의 분리가 잘 이루어졌다.

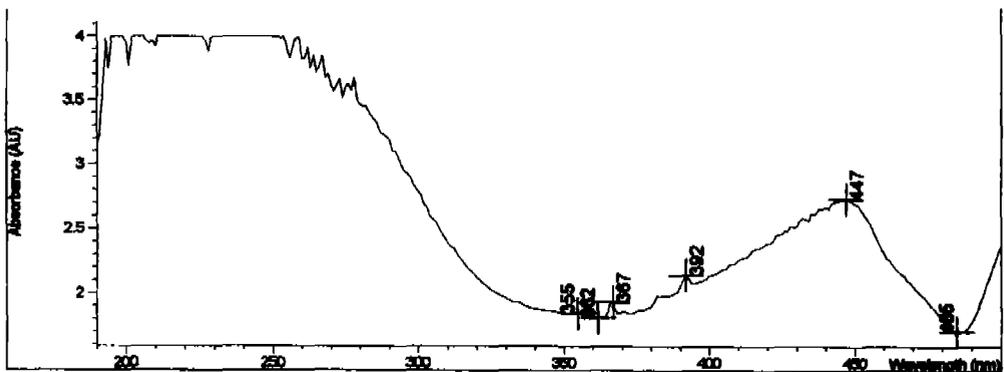


Fig. 10. UV-absorption spectrum of hexane fraction obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

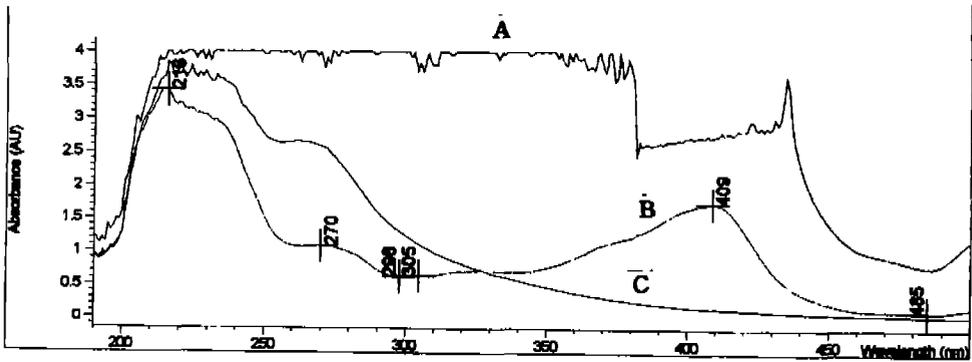


Fig. 11. UV-absorption spectrum of each fractions obtained from methanol extracts of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

(A, chloroform fraction; B, ethyl acetate fraction; C, distilled water fraction)

2) 이동상의 선택

모든 이동상은 methanol과 3차 증류수의 비를 95 : 5로 설정하였으며, Table 10과 같은 조건으로 분리하였다.

Table 10. Condition for analysis of *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*) extracts by HPLC

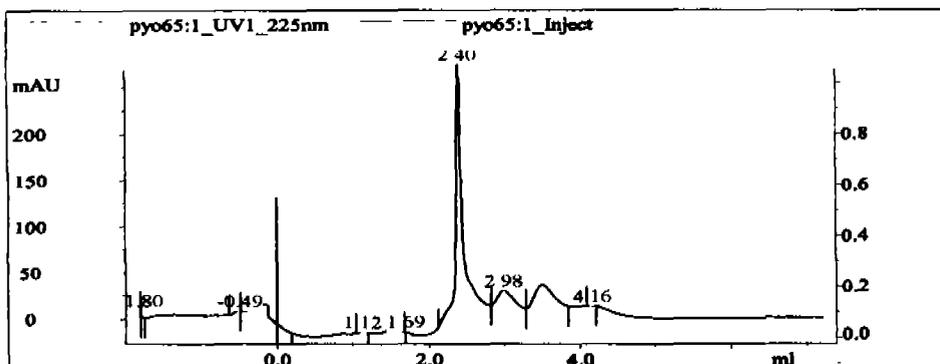
Instrument	Amersham Biotech Asia AKTApurifer
Column	Alltech C ₁₈ column(250×4.1mm)
Detector Wavelength	225nm
Column temperature	Room temperature
Flow rate	1ml/min
Solvent system	Methanol: H ₂ O(95:5)
Injection volume	10μl

3) HPLC에 의한 분획

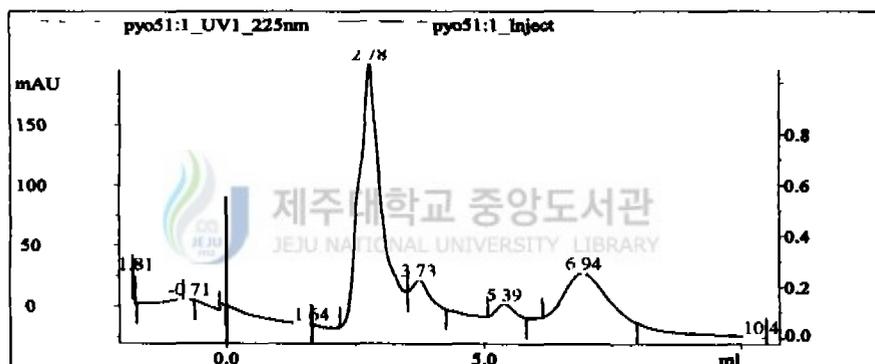
각 분획물을 HPLC에 의해 분석해낸 chromatogram은 *Fig. 12*에 나타내었다. A는 hexane 분획물에 대한 chromatogram을 보인 결과이고, B와 C는 각각 chloroform, ethylacetate의 분획물에 대한 분석 결과이다.

hexane 분획물의 각 성분을 분리, 정제하기 위하여 C₁₈ colum(Alltech), 메탄올과 증류수(95:5) 이동상, injection volume은 10 μ l을 사용하여 측정한 결과는 retention time(RT)이 2.40, 2.98, 3.48인 peak를 나타내었다. 각 peak의 물질을 분리, 정제하기 위하여 retention time을 0.7로 나눠 각 peak의 물질을 분리할 수 있었다. (*Fig. 13*). 이 중 가장 함량이 큰 RT 2.40 물질이 항돌연변이원능을 검정하였는데, 이 물질에 대한 UV 흡수 spectra 특성은 275nm에서 극대흡수를 보여주었다(*Fig. 14*).

A



B



C

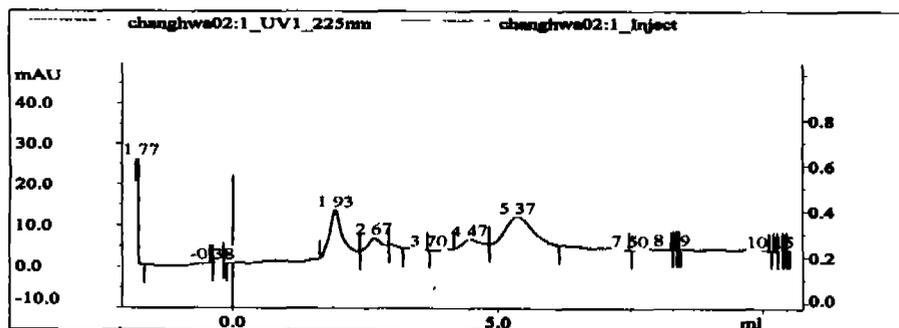


Fig. 12. HPLC analysis of fractions obtained from the *Hijiki* (*Hizikia fusiforme*).

(A: hexane fraction, B: chloroform fraction, C: ethyl acetate fraction)

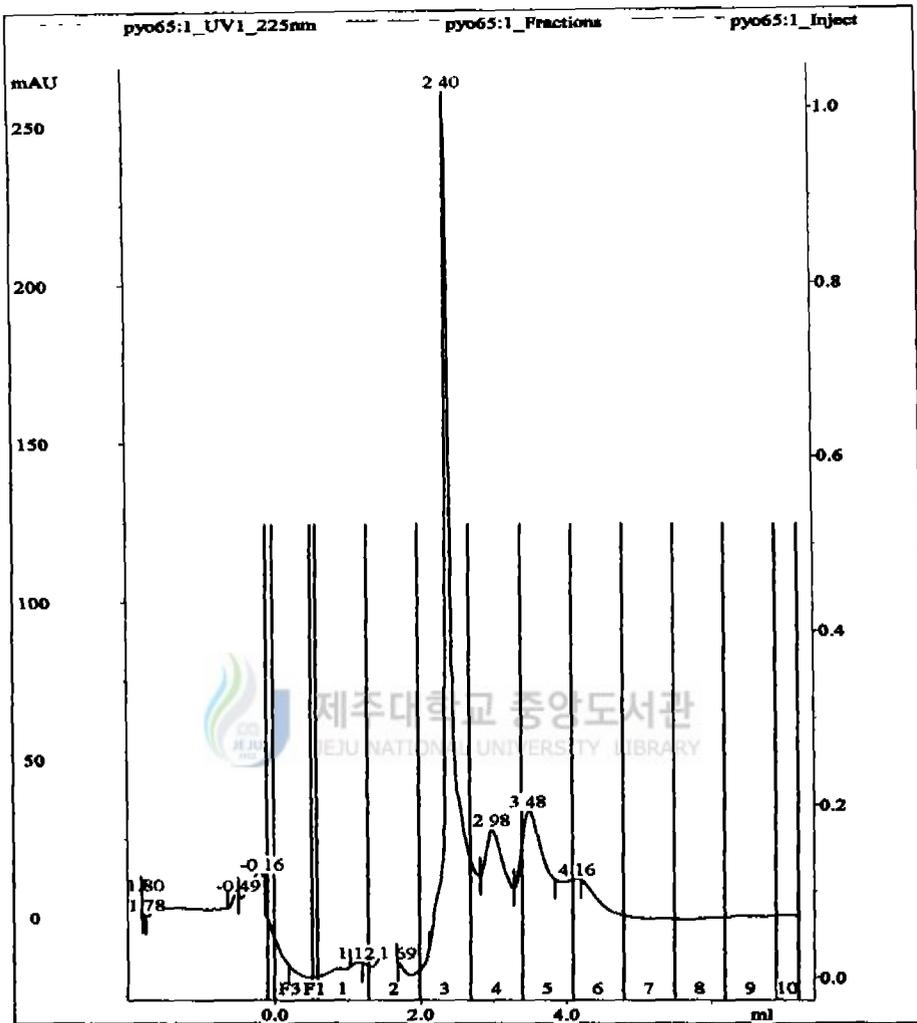


Fig. 13. HPLC analysis of hexane fraction obtained from the *Hijiki*(*Hizikia fusiforme*).

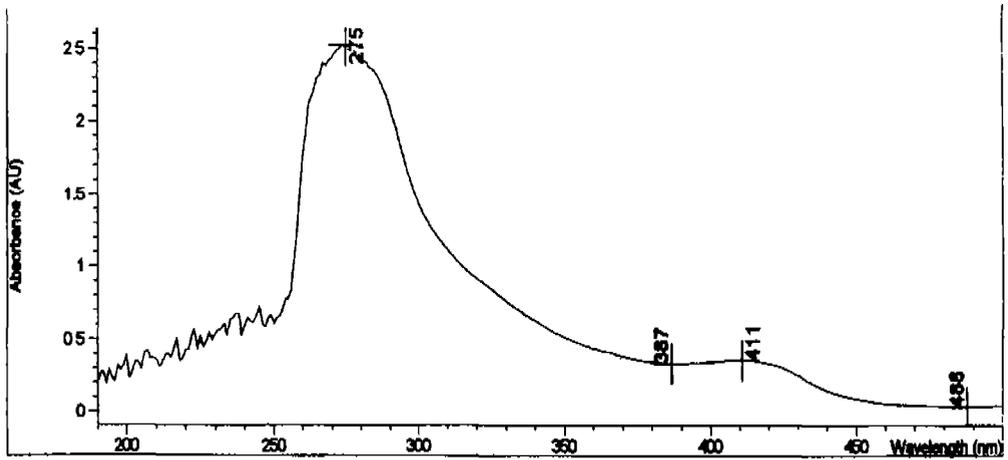


Fig. 14. HPLC profile of compound separated from hexane fraction.

5. 분리된 물질의 항돌연변이 효과에 대한 재검정

롯데탄을 추출물로부터 분획한 n-hexane 분획물을 HPLC로 분리한 물질의 항돌연변이 효과에 대한 재검정에 사용된 균주는 TA97, TA98, TA100 및 TA102이고 돌연변이원 물질은 ICR191, NPD 및, 4-NQO를 사용하여 plate test로 검정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

hexane 분획물로부터 분리해낸 RT 2.4인 물질이 돌연변이원 물질 ICR191에 의해 유도된 복귀돌연변이의 억제효과는 Table 11과 Fig. 15에 나타내었다. 시료량의 첨가량이 50 μ l/plate일 때는 72%의 억제 효과를 보이며, plate 당 100 μ l에서는 80%의 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 즉, 투여량이 증가하면서 돌연변이 억제효과는 높게 나타났으며, 구조이동성 돌연변이원에 대하여 복귀 돌연변이를 유도하는 TA97에 대하여 높은 활성을 보여주고 있다.

NPD에 대한 RT 2.4인 물질의 항돌연변이 억제 효과는 13%, 24%의 낮은 항돌연변이 효과를 나타내었는데, 이는 같은 구조이동성 돌연변이원에 대해서도 돌연변이 부위에 6개의 cytosine이 연결시켜 추가적인 cytosine을 지닌 돌연변이원에 민감하게 작용 하는 것으로 추정된다.

4-NQO에 대한 RT 2.4의 항돌연변이 효과는 첨가량이 증가하면서 TA100에서는 60%와 68%의 억제효과를, TA102에서는 78%와 82%의 억제효과를 보였으며, 염기치환성 돌연변이원에 대해 높은 활성을 보이고 있다. TA100보다 TA102에서 다소 높은 활성을 보이고 있는데, 이는 DNA의 A-T 염기치환성 돌연변이원을 억제하는 효과가 크다는 것으로 추정할 수 있다.

따라서 n-hexane 분획물에서 분리된 3개의 물질 중 RT 2.4 물질의 항돌연변이원성은 높은 효과를 보이고 있기 때문에 이에 대한 종합적인 물질 규명에 대한 연구가 이루어져야 하겠고, 또한 RT 2.98 및 RT 3.48 물질에 대한 항돌연변이능 및 물질규명으로 뜻의 항돌연변이 활성을 보이고 있는 주 물질을 규명하는데 많은 노력이 필요할 것으로 본다.



Table 11. Antimutagenic effects for mutations by compound RT 2.4 purified from hexane fraction.

Compound	Dose ($\mu\text{l}/\text{plate}$)	Revertants per plate			
		TA97 ICR191	TA98 NPD	TA100 4NQO	TA102 4NQO
Positive control		607	1,342	502	1,008
RT 2.4	50	167 \pm 18(-72)	1,169 \pm 33(-13)	202 \pm 14(-60)	220 \pm 15(-78)
	100	120 \pm 23(-80)	1,015 \pm 45(-24)	162 \pm 9(-68)	180 \pm 12(-82)

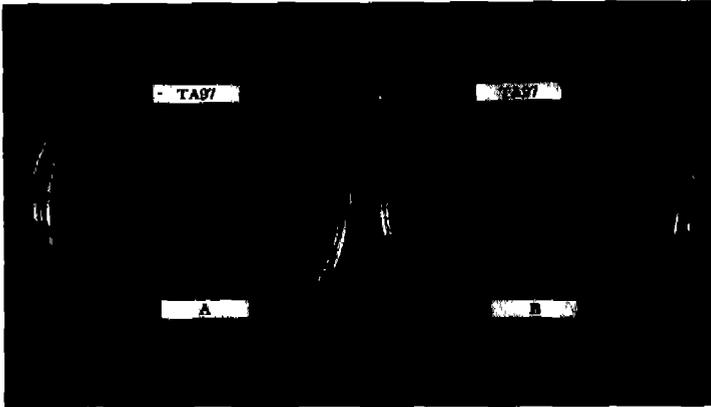


Fig. 15. Plate test for ICR191-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA97.

(A, positive control; B, added fraction obtained by using HPLC from hexane fraction)

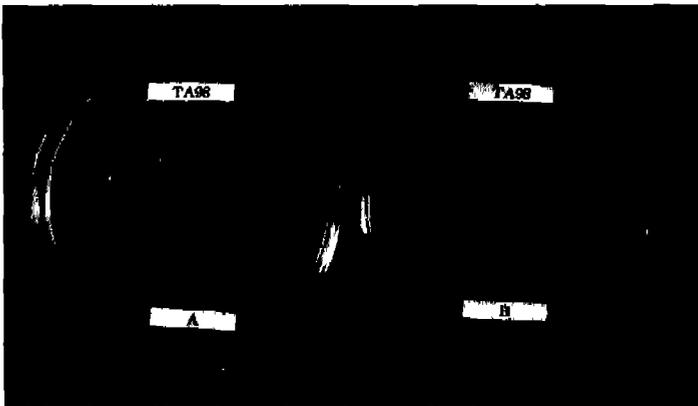


Fig. 16. Plate test for NPD-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA98.

(A, positive control; B, added fraction obtained by using HPLC from hexane fraction)

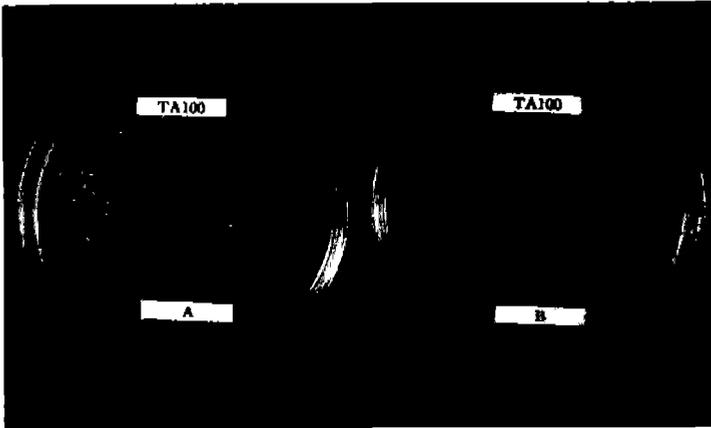


Fig. 17. Plate test for 4NQO-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA100.

(A, positive control; B, added fraction obtained by using HPLC from hexane fraction)



Fig. 18. Plate test for 4NQO-induced mutations of compound obtained from hexane fraction in *S. typhimurium* TA102.

(A, positive control. B, added fraction obtained by using HPLC from hexane fraction)

요약

툇 메탄을 추출물로부터 순차 분획한 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물 분획물에 대한 항돌연변이 활성을 조사하였다.

툇 메탄을 추출물의 항돌연변이 효과는 plate당 100 μ l 투여시 80% 이상의 항돌연변이 효과를 나타내었으며, 메탄을 추출물에 대한 각 순차분획물의 항돌연변이 효과는 수용성 분획물 보다는 유기용매에 의한 분획물의 항돌연변이 효과가 높았으며, 시료의 첨가량이 증가하면서 더 높은 항돌연변이 활성을 보여주었다.

구조이동성 돌연변이인 TA97과 TA98에서 직접변이원 물질인 ICR191과 NPD에 대한 용매별 분획물의 항돌연변이 효과중 n-hexane 분획물이 80% 이상의 높은 활성을 보였으며, 염기치환성 돌연변이 균주인 TA100과 TA102에서 직접변이원 물질인 NPD와 4-NQO의 항돌연변이 시험에서도 n-hexane 분획물의 항돌연변이 효과가 가장 높았고, 특히 시험균주 TA100에 대한 4-NQO의 항돌연변이 효과가 매우 높았다.

추출 시간에 대한 항돌연변이 효과는 수용성 분획물인 경우 3시간 추출물이 더 높은 항돌연변이 효과를 보였고, 용매별 분획물에서는 차이가 미비하였다. 특히 3시간 추출물에 대한 n-hexane분획물의 수율 보다 12시간 추출물의 n-hexane 분획물의 수율이 8배 이상 높은데도 항돌연변이 효과의 차이는 거의 없었다.

항돌연변이 효과가 가장 높은 n-hexane 분획물을 HPLC에 의해 분리하였을 때 4개의 물질로 분리가 되었는데, 이 중 가장 많은 함량을 차지하는 RT2.4인 물질은 돌연변이원 물질인 ICR191, NPD, 4-NQO에 의해 유도된 복귀돌연변이 수를 억제하는 효과가 상당하였으며, 특히, 염기치환성 변이원 물질인 4-NQO에서 78%이상의 높은 활성을 보여주었다.

참고문헌

- Amano, H., 1991. Biochemistry and biotechnology of seaweed. in Marine biochemistry, K. Yamaguchi, (ed.), *Tokyo university press, Japan*, 170~171.
- 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. and J. McCann and E. 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.
- Ames, B.N. and J. McCann, 1982. Validation of the *Salmonella* test, *Cancer Res.* 41, 4192.
- Bronzetti, G., 1994. Antimutagens in food, *Trends in Food Science & Technology December*, 5, 390~395.
- 조득문, 김두상, 이동수, 김형락, 변재형, 1995. 식용해조류중의 미량요소와 특수기능성 당질-I: 산지와 채취시기별 일반성분의 조성파 무기원소의 분포. *한국수산학회지*, 28(1), 49~59.
- 조재선. 1988. 식품재료학. 기전연구소, 서울, p.336.

Cho, K.J., Y.S. Lee and B.H. Ryu, 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweed *Sarcocystis* 180. *Bull. Korean Fish Soc.* 23(5), 345~352.

Cho, E.J., S.H. Rhee, K.Y. Park, 1998. Antimutagenic and Anticarcinogenic effects of alginic acid extracted from *Sporophyll* of sea mustard. *J. Food Sci. Nutr.* 3(2), 169~174.

Church, F.C., J.B. Meade, R.E. Treanor and H.C. Whinna, 1989. Antithrombin activity of fucoidan. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(6). 3618~3623.

Committee 17 Appointed by Council Environmental mutagen Society, 1975. *Environmental mutagenic hazard. Science*, 187, 503~514.

도정룡, 남윤주, 박진희, 조진호, 1997. 국내산 홍조류의 구성성분에 관한 연구. *한국수산학회지*, 30(3), 428~431.

도정룡, 구재근, 조길석, 김영동, 이남혁, 홍상필, 양승용, 김동수, 박진희, 1997. 톳을 이용한 건강 편의 식품개발에 관한 연구. *농림부*, 1~102.

Doll, R. and R. Peto, 1981. The causes of cancer, qualitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 1191~1308.

동아원색세계대백과사전, 1983. 동아출판사, 서울, 28권, 202.

Fujihara, M. and T. Nagumo, 1993. An influence of the structure of

alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydrate Res.*, 243, 211.

Gary, J.I. and J.R. Dugan, 1975. Inhibition of *N*-nitrosamine formation in model foods systems. *J. Food Sci.* 40, 981~984.

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

황우익, 이성동, 손홍수, 백나경, 지유환, 1990. 마늘 성분에 의한 면역 증강 및 항암 효과. *한국영양식량학회지*, 19(5), 494~508.

Hayatsu. H, S. Arimoto, K. Togawa and M. Makita, 1981. Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutation Research*, 81. 289~290.

Hayatsu, H. 1991. Mutagens in Food: Detection and Prevention. *CRC Press Boston*.

Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi. 1988. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 202, 429~446.

Heathcote, J.G. and J.R. Hibbert, 1978. Aflatoxins: Chemical and Biological Aspects, Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 83.

Hosono, A., R. Wardojo and H. Otani, 1990. Inhibitory effects of lactic

acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1639~1643.

Hotchkiss, J.H., D.C. Havery and T. Fazio, 1981. Rapid method for estimation of *N*-nitrosodimethylamine in malt beverage. *J. AOAC*, 64(4), 929~932.

Hotchkiss, J.H., 1988. A review of current literature on *N*-nitroso compounds in foods. *Advances in Food Research*, 31, 55~115.

Human, B.F., 1993. Designing manipulating foods to promote health. *Inform.*, 4, 344.

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.

Kada, T., K. Morita and T. Inoue, 1978. Antimutagenic action of vegetable factor on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.*, 53, 351.

Kato, H., I.E. Lee, N.V. Chuyen, S.B. Kim and F. Hayase, 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidin. *Agric. Biol. Chem.* 51(5), 1333~1338.

김경임, 서혜덕, 이현순, 조홍연, 양한철, 1998. 톳 열수출물로부터 분리한 혈액 항응고성 다당류에 관한 연구. *한국식품영양과학회지*, 27(6), 1204~1210.

- 김청, 박정룡, 김종배, 차명화, 1999. 대추잎 추출물의 생리활성 작용. 한국식품영양과학회지, 28(3), 593~598.
- 김두상, 이동수, 조득문, 김형락, 변재형, 1995. 식용해조류중의 미량 요소와 특수기능성 당질. 한국수산학회지. 28(3). 270~278.
- 김인수, 김선봉, 박영호, 1994. Maillard 반응생성물의 돌연변이원성에 대한 해조 및 야채추출물의 억제효과. 한국수산학회지, 27(2), 133~139.
- 김남득, 임은옥, 1996. 환경 오염 물질과 암 발생의 최근 동향. 생명과학회지, 6(2), 149~158.
- 김외경, 이태기, 박영범, 박덕천, 이용우, 여생규, 김인수, 박영호, 김선봉, 1996, 해조류 추출물의 Xanthine oxidase 저해작용. 한국식품영양과학회지, 25(6), 1069~1073.
- Kim, S.H., J.O. Kim, S.H. Lee, K.Y. Park, H.J. Park and H.Y. Chung, 1991. Antimutagenic compounds identified from the chloroform fraction of garlic(*Alliumsativum*). *Korean Soc. Food Nutr.*, 20(3), 253~259.
- 김수현, 고영환, 임상빈, 1998. 수출용 수산신제품 개발. 해양수산부, 92~123.
- 구재근, 조길석, 도정룡, 박진희, 양차범, 1995. 툟과 모자반 fucoidan의 화학적 특성. 한국수산학회지, 28(5), 659~666.
- 구경숙, 신정혜, 정미자, 이수정, 성낙주, 1999a. 시판 무김치 중의 N-Nitrosamine. 한국식품영양과학회지, 28(1), 28~32.

구경숙, 신정혜, 정미자, 이수정, 성낙주, 1999b. 깎두기 숙성 중 *N*-Nitrosamine의 생성. 한국식품영양과학회지, 28(1), 33~39.

국립수산물검사소, 1996. 수산물검사연보, 통계청 승인 간행물, 137-01.

Lai, C.H., M.N. Butler and T.S. Matney, 1980. Antimutagenic activities of common vegetable and their chlorophyll content. *Mutation Research*, 77, 245.

Lahaye, M., 1991. Marine algae as sources of fibers: determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some 'sea vegetables' . *J. Sci. Food Agric.*, 54, 587~594.

Lee, Y.S., D.S. Kim, B.H. Ryu and S.H. Lee, 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward Sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21(5), 544~550.

이경임, 박건영, 이숙희, 1992. 아플라톡신 B₁과 4-NQO에 대한 녹황색 채소류의 항돌연변이효과. 한국영양식량학회지, 21(2), 143~148.

Levin, D.E., E. Yamasaki and B.N. Ames, 1982. A new *salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation Research*, 94, 315~330.

Levin, D.E, M. Hollstein, M. Christman, E.A. Schwiers and B.N. Ames, 1982. A new *Salmonella* tester strain(TA102) with A·T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 79, 7445~7449.

Lijinsky, W., 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Res.*, 259, 251.

Lim S.Y, S.H. Rhee and K.Y. Park., 1997. Antimutagenic Effects of Linoleic Acid. *J. Food Sci. Nutr.* 2(1), 31~34.

藏多一哉. 1979. 海藻の抗生物質. 海洋の生化学資源, 6章. 日本水産學會篇, 恒生社厚生閣, 東京, pp. 80.

Mackie, E. and R.D. Preston, 1974. Cell wall and intercellular region polysaccharides. "Algal physiology and biochemistry". Stewart, W.D. Ped., *Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford*, 58~75.

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 *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 175~215.

Mautner, H.G., G.M. Gardner and R. Pratt, 1953. Antibiotic activity of seaweed extracts-II. *Rhodomela larix*. *J. Am. pharm. Assoc.*, 42, 294~296.

McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B.N. Ames, 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of

300 Chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 5135~5139.

McCan, J. and B.N. Ames, 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome system: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 950~954.

Mirvish, S.S., 1970. Kinetics of dimethylamine nitrosation in reaction to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 44, 633~639.

Moon, S.H., J.O. Kim and K.Y. Park, 1996. Antimutagenic compounds identified from chloroform fraction of Persimmon leaves. *J. Food Sci. Nutr.*, 1(2), 203~207.

Nakamura, M., T. Kawabata, 1981. Effect of japanese green tea on nitrosamine formation *in vitro*. *J. Food Sci.*, 46(1), 306~307.

Nishimune, T., T. Sumimoto, T. Yakusiji, N. Kunita, T. Ichikawa, M. Doguchi and S. Nakahara, 1991. Determination of total dietary fiber in japanese foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 350~359.

Noda, H., H. Amano, K. Arashima, S. Hashimoto and K. Nisizawa, 1989. Antitumour activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Susan Gakkaishi*, 55, 1265~1271.

Numata, A., S. Kanabara, C. Takahashi, R. Fujiki, M. Yoneda, Y. Usami and E. Fujita, 1992. *Phytochemistry*, 31, 1209.

오창경, 1997. 김치의 (항)돌연변이원성과 유산균에 의한 아질산염 소거. 제

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. 食衛誌, 34(2), 120~127.

Okai, Y., O.K. Higashi and S. Nakamura, 1993. Identification of heterogeneous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds. *Mutat. Res.*, 302, 63.

Ong, T.M., W.Z. Whong, J. Stewart and H.E. Brockman, 1986 .Chlorophyllin; a potent antimutagen aganist environmental and dietary complex mixture. *Mutation Research*, 173, 111.

大澤俊彦, 1990. 食品變異原の生成と抑制. 日本食品工業學會誌, 37(4), 311~319.



Oshima, H. and T. Kawabata, 1977. Mechanism of the N-nitrosodimethylamine formation from trimethylamine. *Bull. Japan. Soc. Fish*, 44(1), 77~81.

박건영, 1984. Aflatoxin과 그 생성에 관련되는 주 요인. 한국영양식량학회지, 13(1), 117.

박영범, 안종관, 유승재, 박덕천, 김인수, 박영호, 김선봉, 1998. 해조류 중의 anti-tumor inhibitor 및 promoter의 해석-4: 발암성 heterocyclicamine에 대한 곰피 추출물 중의 돌연변이원성 억제인자. 한국식품영양과학회지, 27(3), 537~ 542.

박영범, 김인수, 유승재, 안종관, 이태기, 박덕천, 김선봉, 1998a. 해조류 중 의

anti-tumor inhibitor 및 promoter의 해석-2: PhIP와 MeIQx의 들연변이 원성을 억제하는 해조 추출물 소재의 연구. 한국수산학회지, 31(4), 581~586.

박영범, 김인수, 유승재, 안종관, 이태기, 박덕천, 김선봉, 1998b. 해조류 중의 anti-tumor inhibitor 및 promoter의 해석-3: 곰피 추출물중 의 발암 promotion 억제인자. 한국수산학회지, 31(4), 587~593.

백형석, 구재관, 전흥기, 1988. *Aspergillus parasiticus*의 aflatoxin 생성과 들연변이 유발능에 미치는 인삼 saponin의 영향. *PNUJ. of Mol. Biol.*, 4, 51~55.

Patterson, D.S.P., 1977. In *Mycotoxin Funge, Mycotoxins, Mycotoxicoses* Marcel Dekker, Inc., New York, and Basel, 1, pp. 136.

Rinkus, S.J. and M.S. Legator, 1979. Chemical characterization of 465 knowor suspected carcinogens and their correction with mutagenic activity in *the Salmonella typhimurium* system. *Cancer Res.*, 39, 3289~3318.

Ryu, B.H, D.S. Kim, K. Cho and D.B. Sin, 1989. Antitumor activity of sea-weeds toward Sarcoma-180. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 21(5), 595.

류병호, 1991. 암을 예방하는 식생활. 한국식품영양학회지, 4(2), 213~229.

Sato, T., Y. Ose, H. Nagase and K. Hayase, 1987. Mechanism of the desmutagenic effect of humic acid. *Mutation Res.*, 176, 199.

- Scanlan, R.A., 1983. Formation and occurrence of nitrosamines in food. *Cancer Res.*, 43, 2435s~2440s.
- Shin, S.H., E.C. Jhee,, N.S. Rapp, I.S. Hong, S.H Chang and D.J. Seel, 1989. Mutagenicity and antimutagenicity of Meju, hot sauce and other korean foods by *Salmonella*/mammalian-microsome test: The 5th Federation of Asian and Oceanian Biochemists, August, 13~18, Seoul, Korea, p.301.
- Shinohara, K., S. Kuroki, M. Miwa, Z.L. Kong and H. Hosoda, 1988. Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1369.
- 송현순, 이현걸, 강명희, 1999. *Salmonella typhimurium* strain TA98, 100에서 감잎차, 녹차, 우롱차 추출물들의 돌연변이 억제효과. 한국식품영양과학회지, 28(3), 599~606.
- Steele, C.M., M. Lilies and C. Ioannides, 1985. Inhibition of the Mutagenicity of Aromatic Amines by the Plant Flavonoid (+)-Catechin. *Cancer Research*, 45, 3573~3577.
- 성미경, 1997. Lignin과 Hemicellulose의 IQ에 의한 돌연변이 억제에 관한 연구. 한국식품영양과학회지, 26(1), 67~71.
- Sugimura, T., 1983. Mutagens, carcinogens and tumor promoters in our daily food. *Cancer(Phila)*, 49, 1970~1984.
- Sugimura, T. and S. Sato., 1983. Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer*

- Sugimura, T., S. Sato and K. Wakabayashi. 1988. Mutagens/carcinogens in pyrolysates of amino acids and proteins and in cooked foods: heterocyclic aromatic amines. IN: Y-T. Woo, D.Y. Lai, J. C. Arcos, and M. F. Argus(eds.), *Chemical Induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms, San Diego: Academic Press*, 3C, 681~710.
- Surono, I.S. and A. Hosono, 1996. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from Dadih against mutagenic Terasi. *Milchwissenschaft*, 51(9), 493~497.
- Suzuki, T., K. Nakai, Y. Yoshie, T. Shirai and T. Hirano, 1993. Seasonal variation in the dietary fiber content and molecular weight of soluble dietary fiber in brown algae, *Hiziki*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1633~1637.
- 久田 孝, 1999. 場内菌相に及ぼす海藻植物繊維の影響に関する研究. 日本水産学会, 65(4), 626~629.
- Thompson, L.H., A.V. Carrano, E. Salazar, J.S. Felton and F.T. Hatch. 1983. Comparative genotoxic effects of the cooked-food related mutagens Trp-P-2 and IQ in bacteria and cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, 117, 243~257.
- Turesky, R.J., S.C. Rossi, D.H. Welti, J.O. Lay and F.F. Kadlubar, 1992. Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of

N-hydroxy-2-amino-3,8-dimethyl imidazo[4,5-*f*]quinoline and *N*-hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline at the C-8 and *N*² atoms of guanine. *Chem Res Toxicol.*, 5, 479.

Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura, 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.(Suppl)*, 52, 2092s.

Yamamoto, I., T. Nagumo, M. Takahasi, M. Fujihara, Y. Suzuki, and I. Iizima, 1981. Antitumor effect of seaweeds III. antitumor effect of an extract from *Sargassum Kjellmanianum*. *J. Exp. Med.*, 51, 187.

Yamamoto, I. and H. Maruyama, 1985. Effect of dietary seaweed preparations on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Letters*, 26, 241.

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 논문이 완성되기까지 항상 세심한 배려와 격려로 저를 지도해주신 김수현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 부족함이 많은 저에게 날카롭고도 정곡을 찌르는 조언으로 논문의 완성도를 높이는데 도움을 주신 하진환 교수님, 송대진 교수님께 감사의 말씀 올립니다. 그리고 많은 학문적 조언과 관심을 아끼지 않으신 김재하 교수님, 강영주 교수님, 고영환 교수님, 임상빈 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

본 논문의 시작에 도움을 주시고 늘 가까이에서 사소한 문제에도 도움을 주시고 마지막까지 교정에 힘써주신 오창경 박사님, 오명철 박사님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 함께 연구하며 도움을 준 식품화학 실험실의 안용석, 고정림 부배님들께도 감사드립니다.

논문을 쓰면서 조금은 소홀했던 연구원 생활을 세심한 배려로 감싸주신 한국식품개발연구원의 박용근 박사님과 최인옥 박사님께 감사드리며 짧은 기간동안 도움을 주신 일반작물팀의 연구원들께 감사드립니다.

아낌없는 사랑으로 큰 힘이 되어 주신 아버지, 어머니께 깊은 감사를 드리며, 가족이라는 한울타리에서 서로 부대끼면서 정을 나누는 누나와 동생들에게도 감사를 드립니다. 항상 학문적인 격려를 해 주신 장인을 비롯한 제가 식구에게도 고마움을 전합니다.

그리고 언제나 나에게 힘이 되어 주었고 앞으로도 희노애락을 같이할 제 제 지현이에게 고마움을 전하며 2세인 우리 딸 은주에게도 든든한 아버지로 살아갈 것을 다짐해봅니다.

이 학계의 논문을 완성함이 길이 아니라 시작임을 상기하면서 나에게 주어진 삶에 최선을 다하여살아가는 것이 이제까지 저를 보살피고 격려해주신 사랑의 보답이라고 생각해 봅니다.