

수산 미이용자원 중에 존재하는 항변이원성 물질의 검색

조순영 · 유병진 · 장미화 · 이수정* · 성낙주*

강릉대학교 식품과학과, *경상대학교 식품영양학과

Screening for Antimutagenic Compounds in Unused Marine Resources by the Modified Ames Test

Soon-Yeong Cho, Byeong-Jin You, Mi-Hwa Chang
Soo-Jung Lee* and Nak-Ju Sung*

Department of Food Science, Kangnung National University

*Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University

Abstract

To detect naturally occurring antimutagenic substances from unused marine resources, the screening for the antimutagenic compounds containing in various solvent extracts of eight unused marine resources by modified Ames test was carried out. The tested unused marine resources were *Asterina pectinifera*, *Halocynthia roretzi* skin, *Nototodarus sloani* ink, *Anthocidaris crassispina* skin, *Sargassum horneri*, *Agarum cribrosum*, *Odonthalia corymbifera* and *Desmarestia ligulata*. The ether extracts of *Halocynthia roretzi* skin showed the only antimutagenic effect among several solvent extracts of tested samples. The effect increased with increasing concentration of the ether extracted ones.

Key words: unused marine resources, solvent extracts, antimutagenic activity

서 론

수산가공폐기물인 어피, 새우·갑각류의 껍질, 오징어·문어의 먹줄, 내장 등에도 다양한 성질을 지닌 collagen, 항균성이 인정되는 키틴·키토산^(1,2), 용균작용이 있는 lysozyme⁽³⁾, 그의 각종 활성효소들이 각각 내재해 있다. 또한, 해조류는 예로부터 항암작용, 성인병예방 등 많은 생리작용이 있는 것으로 알려진 식품원이며, 근래에는 많은 양이 양식되어 그것의 보다 효율적이고 부가가치 있는 용도로의 소비가 절실히 요구되고 있다. 그러므로 전량 폐기, 방치하고 있는 수산미이용자원들로부터의 항균성, 항산화성 및 항변이원성 물질의 검색은 최근 관심과 그 필요성이 증가하고 있는 천연 생리활성물질개발 측면에서는 물론이고 미이용 수산자원의 효율적 재이용의 측면에서도 절실한데, 이들 수산 미이용자원에 대한 유용 항균성 및 항산화성 물질 내재여부는 전보의 보고들^(4,5)에서 저자 등이 살펴보았다.

항변이원성 물질 검색에 관련된 연구로는, 식품성분으로서 식물조직 중에 단독 혹은 배당체로 널리 함유되어 있는 polyphenol 화합물이 종양의 억제 작용이 있다고 한 材上의 보고⁽⁶⁾가 있으며, Kada 등⁽⁷⁾은 차엽의 polyphenol

성분 중 catechin류가 항돌연변이 작용 또는 종양의 발생을 억제시킨다고 하였다. Kim⁽⁸⁾은 최근 비효소적 갈변반응생성물들의 변이원 성질에 대하여 검토해 본 결과 여러 성분들이 항돌연변이원성 효과가 있었다고 보고하였으며, 김 등⁽⁹⁾은 마늘의 메탄올 추출물을 클로로포름층과 수층으로 분획하여 각 추출물의 aflatoxin B₁(AFB₁)에 대한 항돌연변이 효과를 시험하였는데 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100에서 클로로포름층이 가장 효과가 크게 나타났으며 클로로포름층을 다시 silica gel column 및 TLC로 분리하여 4개의 분획(ASC F1, 2, 3, 4)을 얻었는데 이 중 methyl linoleate가 다량 함유되어 있었던 ASC F2가 AFB₁에 대해 항돌연변이 효과가 가장 컸다고 하였다. 또한 박 등⁽¹⁰⁾은 마늘의 돌연변이 유발 억제효과와 사람의 HT-29 결장암 세포의 성장저해 효과에 대하여 검토 보고하였으며, 해조류를 시험재료로 한 연구로는 미역, 다시마, 곤피, 청각, 파래 및 김을 물, 메탄올, hexan 및 에칠 에테르로 추출한 엑스분의 항돌연변이 효과를 *Salmonella typhimurium/microsome*계로 실험 보고한 Ryu 등⁽¹¹⁾의 보고가 있다. 이와같이, 현재까지 항변이원성제 개발에 관한 보고로는 주로 향신료나 육상식물을 대상으로 한 것이 대부분이며 수산물에 대한 항변이원성물질 검색에 관한 보고는, 몇⁽⁹⁾되지 않는다. 그러므로, 본 연구에서는 수산가공폐기물 및 해조류의 효율적 이용과 더불어 강력한 천연생리활성물질의 개발 가능성을 모색하기 위하여, 바다 양식장에서 왕성한 번식력과 성

Corresponding author: Soon-Yeong Cho, Department of Food Science, Kangnung National University, San-1, Jibyen-dong, Kangnung, Kangwondo 210-702, Korea

강력으로 전복 등 식용패류의 천적으로 심각한 문제가 되고 있는 별불가사리를 비롯하여, 하천과 연안오염의 주범이며 전량 폐기되거나 방치되고 있는 오징어먹집, 성게껍질, 우렁쉥이껍질 등의 수산폐기물과 구멍쇠미역, 산말, 모자반, 참빗꿀 등의 식용·비식용 해조류에 존재하는 항변이원성 물질 검색을 시도하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료조제

전보⁽⁴⁾와 동일한 재료로 전보⁽⁴⁾와 같이 생리활성물질 추출용 시료조제를 하였다.

항변이원성 물질 추출방법

전보⁽⁴⁾의 8종의 수산 미이용자원에 대한 생리활성물질의 추출 방법과 동일하게 시도하였다. 즉, 미리 진공동결건조해둔 시료 100g을 증류수 2,000 ml로 24시간 교반추출한 후 원심분리(Hitachi, Japan: 7,000 rpm, 4°C, 15 min)하여 추출액과 잔사를 얻었다. 이 추출액은 진공동결건조시켜 water fraction으로 하였으며 잔사에 대해서는 diethyl ether, acetone, methanol의 순으로 추출하여 ether fraction, acetone fraction, methanol fraction을 얻어 회전식 진공증발기(Heidolph, Germany)로 농축시켜 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma chem. Co., U.S.A.)에 녹인 후 냉장고에 보관하면서 검색용 시료로 사용하였다.

항변이원성 검사

균주 및 균주의 보존: 사용균주는 자외선에 의한 DNA 손상을 수복하는 반응계가 없고, 세포 표면의 lipopolysaccharide가 없어 물질의 투과성이 높으며, 약제내성인자인 plasmid pKM 101(R 인자)이 존입되어 있어 항변이원성 검색감도가 높은 염기 치환형 변이주인 histidine 요구주 *Samonella typhimurium* TA 100(KCTC 2054)로 하였다.

균주의 보존은 0.5% NaCl을 가한 nutrient broth(8g/1,000 ml) 10 ml에 균을 접종(L-자관 사용)하여 37°C에서 14~16시간 진탕배양시킨 후 균배양액 4.0 ml와 DMSO 0.35 ml를 10 ml 용량의 멸균된 cap tube에 넣어 -50°C 동결고에 보존하였다. 균을 배양액에 접종할 때는 동결된 균배양액이 해동되기 전에 냉동상태에서 접종하였다.

한천평판배지의 조제: 최소한천배지의 조제는 Vogel-Bonner 최소배지에 2% glucose와 1.5%의 한천을 가한 것을 사용하였다. 즉, Vogel-Bonner 최소배지는 MgSO₄·7H₂O 2g, citric acid monohydrate 10g, K₂HPO₄ 100g, NaNH₄HPO₄·4H₂O 35g을 증류수에 용해시켜 1,000 ml로 하여 100 ml씩 나누어 고압증기멸균한 후 보존하였으며, 최소 glucose-한천배지는 Vogel-Bonner의 최소배지 100 ml, glucose 20g 및 한천(Difco) 15g의 비율로 조제하여 각각의 용기에 증류수를 적당히 분주하고(1:1:7 정도) 고압증기멸균시킨 뒤 혼합하여 멸균 petri dish에 25 ml씩 분주하여 항변이원성 검색에 사용하였다.

연한천(soft agar)의 조제: 균을 균일하게 최소한천배지에 도포하기 위한 soft agar로는 0.6% NaCl과 0.7% 한천을 가한 배지를 100 ml씩 각각 용기에 나누어 멸균하여 보존하면서, 사용시에는 가온하여 완전히 용해시킨 뒤 1/10 용량(100 ml에 10 ml씩)의 미리 멸균한 0.5 mM L-histidine-0.5 mM biotin 용액을 가하여 혼합하여 45°C로 조절 유지하면서 사용하였다.

균의 전배양(前培養): 균의 전배양(前培養)은 0.5% NaCl을 가한 nutrient broth(8g/1,000 ml) 5 ml씩을 L-자관(12×9×1.6 cm)에 덜어 고압증기멸균한 다음 냉장시키고 여기에 동결보존하여둔 균을 접종하여 37°C에서 14~16시간 진탕배양(60~70 rpm/min)하였으며 균배양액은 사용직전까지 얼음 중에 보존하였다.

한편, S-9 mix 무첨가 시료조제용 인산완충액은 100 mM Na-phosphate buffer(pH 7.4)로 하였으며 항변이원성 검색시에는 1 ml 피펫을 사용하여 시험관당 0.5 ml씩 첨가하였다.

돌연변이 유발 물질의 조제: 돌연변이 유발물질로는 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide[AF-2](Waco pure chemical industries, Ltd., Japan)를 사용하였으며 실험하기 직전에 조제하여 사용하였고, 첨가량은 20 µg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹인 후 100배로 희석하여 plate당 10 µg씩 첨가하였다.

시료추출구의 항변이원성 검색: 항변이원성 검색은 Ames의 방법에 preincubation법을 적용시킨 Takei 방법⁽¹²⁾으로 하였다. 즉, 각각의 멸균 시험관에 적정 농도로 조제한 돌연변이 유발물질인 AF-2를 10 µg씩 주입하고 100 mM Na-인산완충액(pH 7.4)을 0.5 ml 가한 후, 균 현탁액 0.1 ml씩을 가하고 시험관 내벽 상부에 미혼합의 액체방울이 남지 않도록 혼합하여 37°C에서 20분간 천천히 진탕하면서 preincubation하였다. 그리고 나서, 미리 0.5 mM L-histidine-0.5 mM biotin 용액을 가하여 45°C로 보존시켜둔 soft agar를 2 ml씩 가하여 혼합한 후 한천배지에 붓고 petri dish를 움직여 균일하게 펼쳐 굳혔다.

Soft agar가 완전히 굳어진 후 배지위에 paper disk를 얹고, 각 시료 추출액을 일정 농도별로 주입시켜 37°C에서 48시간 배양시킨 후, paper disk 주위의 생장 저지된 발생 여부로써 항변이원성 유무를 검색하였다. 항변이원성 효과가 있었던 시료 추출구에 대해서는 농도별로 저지된 크기를 측정하여 항변이원성 정도를 검정하였다.

결과 및 고찰

8종의 수산 미이용자원의 순차용매 추출구들의 시료 추출구별 항변이원성 검색 결과는 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이, 전 시료 추출구 중 우렁쉥이 껍질의 에테르 추출구에서만 변이원 활성 억제효과가 나타나 다른 미이용 시험대상 수산동물과 해조류 시험대상 시료의 추출구 중에서는 항변이원성 물질이 존재하지 않는 것으로 관찰되었다. 우렁쉥이 껍질의 에테르

Table 1. Antimutagenic effect of several organic solvent fractions isolated from unused marine resources on the mutagenicity by AF-2¹⁾

	Water	Ether	Acetone	Methanol
<i>Asterina pectinifera</i>	-	-	-	-
<i>Halocynthia roretzi</i> skin	-	+	-	-
<i>Nototodarus sloani</i> ink	-	-	-	-
<i>Anthocidaris crassispina</i> skin	-	-	-	-
<i>Agarum cribrosum</i>	-	-	-	-
<i>Sargassum horneri</i>	-	-	-	-
<i>Desmarestia ligulata</i>	-	-	-	-
<i>Odonthalia corymbifera</i>	-	-	-	-

± Mean whether clear zone detected

¹⁾Antimutagenicity was assayed with preincubation method using *S. typhimurium* TA 100 in the absence of S-9 mix.

추출구의 농도에 따른 항변이원성 정도를 살펴보기 위해 추출액의 농도를 달리하여 변이원성 억제효과를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다.

우렁쉥이 껍질의 에테르 추출액을 225 µg/disk 주입시 저지원의 크기가 20 mm로 나타났으며, 주입농도를 2배, 3배 및 4배로 증가시키에 따라 저지원의 크기가 각각 21, 23, 24 mm로 증가되어 paper disk에 주입하는 추출액의 농도가 높을수록 항변이원성이 증가하는 경향을 보였다.

박 등⁽¹⁰⁾은 마늘의 메탄올 추출물의 농도를 증가시켰을 때 *Samonella typhimurium* TA 98과 TA 100에서 모두 아플라톡신 B₁(AFB₁)에 대하여 돌연변이 억제효과가 증가되었고 이를 다시 분획하였을 때 비극성 분획인 클로로포름 분획에서 더 큰 돌연변이 유발 억제효과를 관찰할 수 있었다고 하였으며, Ryu 등⁽¹¹⁾은 미역 등 6종의 식용 해조류의 항돌연변이 효과를 시험한 결과 에테르의 엑스분이 MeIQ와 AFB₁에 대하여 우수한 항돌연변이 효과가 있었다고 보고하였는데, 본 실험에서도 우렁쉥이 껍질 추출구 중 비극성인 에테르 추출구에서만 큰 항변이원성 효과를 가지는 것으로 나타난 바, 우렁쉥이 내재 변이원성 억제물질은 대체로 극성용매에서 보다는 비극성 용매에서 추출되는 성분에 많이 내재해 있을 가능성이 높은 것으로 사료되었다. 그러나 아직 변이원성에 대한 활성저해작용 메커니즘이 확실히 밝혀져있지 않으므로, 본 실험에서 항변이원성 물질이 다량 내재해 있는 것으로 나타난 우렁쉥이 껍질 에테르 추출구에 대하여 분리정제와 더불어 항변이원성 물질의 구조결정에 대한 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 생각되어 현재 우렁쉥이 껍질 중의 항돌연변이원 물질의 순수 분리 동정을 시도중에 있다.

요 약

천연 생리활성물질의 개발과 수산미이용자원의 효율적

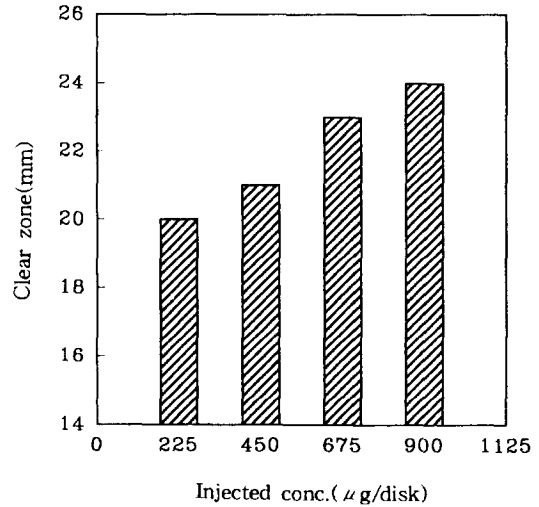


Fig. 1. Antimutagenic effect of ether fraction extracted from *Halocynthia roretzi* skin on the mutagenicity by AF-2

이용방안을 모색하기 위하여 별불가사리, 오징어먹집, 성게껍질, 우렁쉥이 껍질, 구멍취미역, 산말, 모자반, 참빗풀 등을 대상으로 물, 에테르, 아세톤, 메탄올로 순차 용매추출하여 각 시료의 각 용매 추출구간별로 항변이원성 물질 검색을 시도하였다.

항변이원성 검색 결과, 8종의 수산 미이용자원의 여러 순차 용매 추출구들 중에서도 단지 우렁쉥이 껍질의 에테르 추출구에서만 변이원 활성 억제효과가 나타났으며, 그 추출액의 농도가 높을수록 항변이원성 효과가 증가하는 경향을 보였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 1991년 특정기초연구과제 연구비 지원(과제번호: 91-0700-14)으로 수행된 연구결과의 일부로서, 이에 깊이 감사를 드립니다.

문 헌

1. Dutkiewicz, J.: Some aspects of the reaction between chitosan and formaldehyde. *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A20**(8), 877 (1983)
2. Kendra, D.F. and Hadwiger, L.A.: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.*, **8**, 276 (1984)
3. 須山三千三, 鴻巢章二, 濱部基次, 奥田行雄: イカの利用. 恒星社厚生閣, 東京, 91 (1980)
4. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호: 수산 미이용자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지, **26**, 261 (1994)

5. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이응호 : 수산 미이용자원 중에 존재하는 항산화성 물질의 검색. 한국 식품과학회지, **26**, 417 (1994)
6. 村上浩紀 : レタクトン類 による 細胞内 DNA 鎖の切断 に関する研究. 日本農藝化學會誌, **57**, 55 (1983)
7. Kada, T., Kaneko, K., Matsuzaki, T. and Hara, Y.: Detection and chemical identification of natural bio-anti-mutagens : A case of the green tea factor. *Mutation Res.*, **150**, 127 (1985)
8. 김선봉 : Maillard 反應生成物の 化學的 解釋과 生物作用. 식품과학, **19**, 25 (1986)
9. 김소희, 김정옥, 이숙희, 박건영, 박희준, 정해영 : 마늘의 클로로포름 분획에서 동정된 항돌연변이 물질. 한국영양식량학회지, **20**, 253 (1991)
10. 박건영, 김소희, 서명자, 정해영 : 마늘의 돌연변이 유발 억제 및 HT-29 결장암 세포의 성장저해 효과. 한국식품과학회지, **23**, 370 (1991)
11. Ryu, B.H., Chi, B.H., Kim, D.S. and Ha, H.S.: Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**(5), 502 (1986)
12. 矢作多貴江 : 環境中の發がん物質を微生物を使ってスクリーニングする實驗法について. 蛋白質・核酸・酵素, **20**, 1178 (1975)

(1994년 9월 2일 접수)