

## 미색동물 및 패류의 Carotenoids 색소성분과 돌연변이 및 종양세포 증식의 억제효과

하봉석<sup>†</sup> · 백승한\* · 김수영

경상대학교 식품영양학과

\*순천제일대학 식생활과

### Carotenoids Components of Tunicata, Shellfishes and Its Inhibitory Effects on Mutagenicity and Growth of Tumor Cell

Bong-Seuk Ha<sup>†</sup>, Seung-Han Baek\* and Soo-Young Kim

Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

\*Dept. of Food Science, Suncheon First College, Suncheon 540-744, Korea

#### Abstract

To investigate the composition of carotenoids present in marine organisms and the biological activity of the carotenoids, carotenoids of the muscles and tunic of tunicates and shellfishes were isolated and identified. Antimutagenic activities of the carotenoids for *S. typhimurium* TA 98 and cytotoxic activity for cancer cell lines were determined. Total carotenoid contents in the muscle of tunicata ranged from 18.65 mg% to 2.39 mg%. The highest amount of the total carotenoid was found in the muscle of *Halocynthia aurantium*, followed by *Styela clava* (HERDMAN), *H. roretzi*, *H. hilgendorfi f. igaboya*, *H. hilgendorfi f. retteri*, *S. plicata* (LESUEUR) in order. Interestingly, total carotenoid content in the muscle of *S. clava* (HERDMAN) was higher than that of *H. roretzi*. Total carotenoid content of all tunicata, other than *H. aurantium* and *H. roretzi*, were higher in muscle than tunic. The major carotenoids in *H. roretzi*, *H. aurantium*, *S. plicata* (LESUEUR), and *S. clava* (HERDMAN) were cyanthiaxanthin (25.1~42.2%), halocyanthiaxanthin (9.7~26.3%), diatoxanthin (8.0~18.7%) and  $\beta$ -carotene (7.7%~21.7%). Similarly, cantaxanthin (19.6%), cyanthiaxanthin (15.4%), halocyanthiaxanthin (14.8%), and (3R,3'R), (3S,3'S)-astaxanthin (22.6%) in *H. hilgendorfi f. retteri* and fucoxanthin (26.6%), cyanthiaxanthin (21.8%), halocyanthiaxanthin (15.2%), and  $\beta$ -carotene (9.3%) in *H. hilgendorfi f. igaboya* were major carotenoids in both tunicate. However, the composition of carotenoids in muscle and tunic of tunicata was similar each other. Among the shellfishes examined, total carotenoid content of the muscle of *Peronidia venulosa* (Schrenck) and *Corbicula fluminea*, and of the gonad of *Atrina pinnata* and *Chlamys farreri*, was ranged from 2.51 to 6.83 mg% which were relatively higher than that of other shellfishes. The composition of the carotenoids of shellfishes, which might depend upon their living environments, was varied. But cyanthiaxanthin (15.9~39.0%) and zeaxanthin (9.6~21.9%) in gonad of *C. farreri*, and muscles of *Buccinum Volutharpa perryi* (JAY) and *Crassostrea gigas*, cyanthiaxanthin (21.5~48.6%) and mytiloxanthin (14.6%) in muscle of *C. fluminea* and gonad of *A. pinnata*, and canthaxanthin (60.6%) and isozeaxanthin (20.5%) in muscles of *P. venulosa* (Schrenck), and  $\beta$ -carotene (23.7~34.8%) and zeaxanthin (18.2~20.4%) in muscles of *Semisulcospira libertina* and *Meretrix lusoria* were major carotenoids. Interestingly, diester type-carotenoids were present along with free type-carotenoids in muscles of *C. gigas*. Antimutagenic effect of the carotenoids isolated from tunicata and shellfishes against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) for *S. typhimurium* TA 98 was proportional to the amount (20, 50 and 100  $\mu$ g/plate) treated. Mutagenicity of IQ was significantly reduced by astaxanthin, isozeaxanthin, mytiloxanthin and halocyanthiaxanthin, whereas the mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) was significantly reduced by  $\beta$ -carotene, isozeaxanthin, and mytiloxanthin. Growth inhibition effect of carotenoids isolated from tunicata and shellfishes for cancer cell was proportional to the amount (5, 10, and 20  $\mu$ g/plate) treated. The growth of HeLa cell by  $\beta$ -carotene, cyanthiaxanthin, astaxanthin and halocyanthiaxanthin, NCI-H87 cell by  $\beta$ -carotene, astaxanthin, cyanthiaxanthin, and halocyanthiaxanthin, HT-29 cell by  $\beta$ -carotene, cyanthiaxanthin, mytiloxanthin and halocyanthiaxanthin, and MG-63 cells by  $\beta$ -carotene, cyanthiaxanthin, astaxanthin, canthaxanthin and halocyanthiaxanthin were statistically reduced.

**Key word:** tunicata, shellfishes, carotenoids, antimutagenic effects, cancer cells

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

## 서 론

어류 이외의 해양 생물을 대상으로 한 carotenoid에 관한 연구를 보면, 미색동물에 관해서는, 멧게류(1-4)에서 몇 종의 xanthophyll과 carotene의 존재가 보고된 이래 참명게, *H. roretzi*(5,6)에서 halocynthiaxanthin과 mytiloxanthinone, 멧게류, *Botrylloides violaceus*(7)에서 peridinine 또한 멧게류, *Amaroucium pliciferum*(8)에서 amarouciaxanthin A와 B의 새로운 carotenoids가 보고되고 있으며, 패류에 관해서는, 이매패(9-13)에는  $\beta$ -carotene이 주요 carotenoid로 존재한다고 보고된 이래 홍합, *Mytilus corusius*(14), 피조개, *Scapharca brough-tonii*, 새조각, *S. subcrenata*, 꼬막류 *S. satowi*, 및 큰이랑 피조개, *S. globosa ursus*(15), 가리비, *Pecten maximus* 및 가리비류, *Patinopecten yessoensis*(16)에서 pectenolone, diatoxanthin, pectenoxanthin, 및 3,4,3'-trihydroxy-7', 8'-didehydro- $\beta$ -carotene을 분리, 동정하였으며, 또한 개랑조개, *Maetra chinensis*에서 maetraxanthin, 진뿔고둥, *Fusinus perplexus*에서 3,4,4-trihydroxypirardixanthin, 3,4,3',4'-tetrahydroxypirardixanthin이 분리, 동정(17)되고 있다

한편, carotenoids의 항종양활성에 관한 연구로는,  $\beta$ -carotene의 강력한 항종양 활성(18)이 밝혀진 이래 mouse embryo 섬유아세포종 C3H/10T1/2에는  $\beta$ -carotene과 canthaxanthin(19)이, C3H10T1/2 및 NIH/3T3에는 crocetin이 각각 종양전이 억제효과가 있었으며(20,21), Raji 세포에 의한 Epstein Barr virus의 early antigen(EBV-EA)의 발현에도  $\beta$ -carotene보다  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein 및 lactucaxanthin이 높은 억제 효과를 보였고(22), mouse의 간세포 단백질의 과산화에도 carotenoids가 공액이 중결합의 수와 비례하여 억제 효과가 있었으며(23). 인체 유방 상피세포의 분열과 변이에도  $\beta$ -carotene과 canthaxanthin이 억제효과를 주는 것으로 알려져 있다(24).

또한 방사선 UV-A 및 UV-B에 의한 종양형성에도 carotenoids에 의해 억제되었으며(25), 유전성의 광민감성 질환인 erythropoietic protoporphyria(EPP)환자는  $\beta$ -carotene의 주사로 종양의 증식이 감소되었고(26),  $\beta$ -carotene과 canthaxanthin을 포함한 식이와 phytoene은 피부암의 증식을 지연시켰으며(27), 구강 내 상피세포 종양을 가진 hamster는  $\beta$ -carotene과 canthaxanthin에 의해 종양의 증식이 억제되었고(28,29). Swiss albino 암쥐의 피부암과 유방암이  $\beta$ -carotene과 canthaxanthin의 경구투여로 억제되며(30), mice의 결장암이  $\beta$ -carotene의 투여에 의해 종양의 50%가 감소되었으며(31). lycopene, lutein,  $\alpha$ -tocopherol 및 palm carotenes 등은 rat의 결장암을 억제하는 효과를 보였다(32)는 보고들을 찾아 볼 수 있었다.

이에 본 실험에서는 해양생물에 다량 함유하는 특이한

carotenoids의 조성과 이들 carotenoids의 생리활성을 밝히고자, 식생활에서 기호하는 멧게류 및 해양산과 담수산 패류에 함유하는 carotenoid 성분을 분리, 동정하였으며, 이들 carotenoids의 돌연변이 및 암세포의 증식 억제 활성을 비교, 검토하여 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 멧게류 및 패류의 시료명, 채취장소, 채취시기 및 시료량은 Table 1과 같고 살아있는 것을 실험실로 운반하여 내장을 제거한 육질 및 껍질만을 취하여 분석용 시료로 사용하였다.

### Carotenoids의 분석

#### 총 carotenoids의 추출

carotenoids의 추출은 전보(33)에서와 같이 시료의 acetone 추출액을 hexane-ethyl ether층으로 전용시킨 후, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로서 탈수시키고  $40^\circ\text{C}$ 이하의  $\text{N}_2$  기류하에서 감압 증류하여 얻은 것을 총 carotenoid로 하였고, 각각 분석용 시료로 사용하였다.

#### Carotenoid의 분리 및 정제

전보(34)에서와 같이 preparative-thin layer chromatography (p-TLC)와 column chromatography(MgO : Celite 545, 1 : 1, w/w)를 실시하여 분리된 획분(Fr.)을 서로 비교하였으며, 분리된 각 carotenoid 획분의 이성체의 분리 및 단일성분임을 확인하기 위하여 총 carotenoids를 전보(33)에서와 같이 Sumichiral OA-2000 column을 이용한 HPLC를 행하였으며, 또한 분리된 carotenoids 획분을 Waters M486 tunable absorbance detector(450 nm)를 이용하여 acetone :  $\text{CH}_3\text{CN}$ (85 : 15)의 이동상 용매를 분당 1.0 mL의 유속으로 Chemcosorb 5CN column (4 mm i.d  $\times$  300 mm)을 사용하여 HPLC(Waters, USA)에 의한 이성체의 분리를 행하였으며, 주요 carotenoids 성분은 전보(34)에서와 같이 분취용 Shim-pack Prep-SIL column을 이용하는 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 순수 결정체를 얻었다.

#### Carotenoid의 동정 및 정량

분리, 정제된 각 획분의 carotenoid는 표준과의 가시부 흡수 spectrum의 비교, 각 획분에서 얻어진 carotenoid와 표준과의 co-TLC, co-HPLC, 전보(34)에서와 같이  $\text{I}_2$ 에 의한 이성화 반응,  $\text{NaBH}_4$ 에 의한 환원반응 및 epoxide test 등에 의하여 동정하였다. 한편, 주요 carotenoids는 HPLC로 분취하여 결정체를 얻은 후, IR spectrum,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 및 Mass spectrum을 전보(33)에서와 같은 기종으로 각각 측정하여 동정하였다. 그리고 총 car-

Table 1. Description of the tunicata and shellfishes used for the analyses of carotenoids

Sample species	Date of caught	Total sample weight (g)	Area caught
Tunicata			
<i>Halocynthia roretzi</i> (Chammeongge)*	10. Jan. 98	2045	Chojeonmyeon, Namhae, Gyeongnam
<i>Halocynthia aurantium</i> (Bulgeunmeongge)	20 Oct. 97	2242	Kangmundong, Kangnung, Gangwon
<i>Styela plicata</i> (LESUEUR) (Hogmdeodeog)	28. Jan. 00	1675	Yongnammyeon, Tongyong, Gyeongnam
<i>Styela clava</i> (HERDMAN) (Mideodeog)	28. Jan. 00	1885	Yongnammyeon, Tongyong, Gyeongnam
<i>Halocynthia hulgendorfi f. Ritteri</i> (Ritteri gaemeongge)	22 Jan. 00	1709	Samdongmyeon, Namhae, Gyeongnam
<i>Halocynthia hulgendorfi f. Igaboja</i> (Igaboja gaemeongge)	22. Jan. 00	1596	Samdongmyeon, Namhae, Gyeongnam
Shellfishes			
<i>Semusulcospira libertina</i> (Daseulgi)	1. Apr. 99	2357	Hamyang, Gyeongnam
<i>Buccinum Volutharpa perryi</i> (JAY) (Kogodung)	1. Feb. 99	8563	Seodong, Samchonpo, Gyeongnam
<i>Crassostrea gigas</i> (Gul)	19. Jan. 00	4761	"
<i>Peronidia venulosa</i> (Schrenck) (Bidanjogae)	11. Mar. 99	274	Jungangdong, Tongyong, Gyeongnam
<i>Meretrix lusoria</i> (Baeghab)	22 Jan. 00	577	Seodong, Samchonpo, Gyeongnam
<i>Corbicula fluminea</i> (Jaecheob)	22. Mar. 99	1370	Hwagaemyeon, Hadong, Gyeongnam
<i>Atrina pinnata</i> (Kijogae)	20. Mar. 99	4659	Seodong, Samchonpo, Gyeongnam
<i>Chlamys farreri</i> (Bidangaribi)	20. Jun. 99	2526	Hyugsanmyeon, Shinan, Chonnam
<i>Panope japonica</i> (Kokkrijogae)	17. May. 99	5897	Gangmundong, Gangnung, Gangwon

\*Represented Korean common name in parentheses.

otenoids의 함량과 분리된 각획분의 조성비는 McBeth의 방법(35)에 따라 흡광계수  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2400$ 으로 하여 전보(33)에서와 같이 계산하였다.

멍게류 및 패류에서 분리한 주요 carotenoid의 항돌연변이원성

Preincubation test는 Maron과 Ames의 방법(36)에 따라 *Salmonella typhimurium* TA 98 균주를 이용하여 실시하였다. 즉, 돌연변이원 물질(ABF: 1.5 µg/plate. IQ: 0.02 µg/plate)을 함유한 cap tube에 S9-cofactor mixture 0.5 mL, 하룻밤 배양된 균주( $1 \sim 2 \times 10^9$  cell/mL) 0.1 mL, DMSO에 용해된 시료 0.1 mL를 가하여 vortex한 후, 37°C에서 30분간 preincubation하였다. 여기에 45°C의 top

agar를 2 mL씩 각 tube에 가하고 minimal glucose agar plate로 도말한 다음 37°C에서 48시간 배양한 후, revertants 수를 계수하여 시료의 항돌연변이성을 측정하였다.

멍게류 및 패류에서 분리한 주요 carotenoid의 종양세포 증식 억제 활성 암세포 배양

HeLa 자궁경암세포, MG-63 골육암세포, NCI 위암세포 및 HT-29 결장암세포는 한국 세포주은행으로부터 분양받아 6~98 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM(자궁경암 및 골육암 세포) 및 RPMI 1640(위암 및 결장암 세포)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, 배양된 암세포는 일주

일에 2-3회 refeeding하고 6-7일만에 원심분리한 후 제대배양하면서 실험에 사용하였다(37,38).

MTT assay

Denizot와 Lang의 방법(39)에 따라 실시하였다. 즉 배양된 암세포는 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L이 되도록 seeding 하고 48시간 동안 배양(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)시킨 후 medium을 제거하고 시료에서 분리한 carotenoids를 일정 농도로 첨가하여 48시간동안 다시 배양시켰다. 여기에 MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)용액을 20  $\mu$ L씩 첨가하여 4시간동안 동일한 조건에서 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan을 DMSO 150  $\mu$ L를 첨가하여 충분히 녹인 후 570 nm에서 ELISA reader(MR-700, dynatech, USA)를 이용하여 흡광도 값을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 SAS package를 이용하여 각 시험군의 평균과 표준편차를 계산하였고, p<0.05의 수준에서 ANOVA test 후에 Duncan's multiple range test에 의하여 각 시험군의 유의차를 검정하였다(40)

결과 및 고찰

멍게류와 패류의 carotenoids의 동정

멍게류와 패류에서 추출한 총 carotenoids를 전보(34)에서와 같이 acetone : petroleum ether(30:70, v/v)의 전개용매로서 p-TLC를 행하여 멍게류에서는 리테르개명제, 패류에서는 굴의 TLC pattern만을 각각 Fig. 1, 2에 나타냈다. 이들 TLC에서 분획된 Fr.을 더욱 분리, 정제하기 위하여 총 carotenoids를 MgO : Celite 545(1:1, w/w)를 흡착제로 한 column chromatography를 행하여 TLC 상의 혼합된 Fr.을 분리, 비교하였으며, 한편 분리된 각 carotenoid 획분의 이성체의 분리 및 단일성분임을 확인하기 위하여 HPLC를 행한 결과, 전보(33,41)에서와 같이 각 시료에서  $\beta$ -carotene, isocryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, diester mixture, canthaxanthin, lutein, zeaxanthin, diatoxanthin, cynthiaxanthin 및 astaxanthin의 carotenoids가 동정되었으며 그 외는 다음과 같은 carotenoid로 확인되었다.

Isocaxanthin : 20% acetone/hexane으로 용출된 Fr.으로서, 가시부 흡수 spectrum의 측정 결과, 흡수 극대치가 449, 478 nm(in p.e.), 448, 476 nm(in ethanol), 463, 490 nm(in chloroform), 461, 488 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 448, 478 nm(in p.e.)로서 1 nm blue shift하였다. IR spectrum의 측정 결과, Vmax 3300 cm<sup>-1</sup>(-OH)의 흡수대

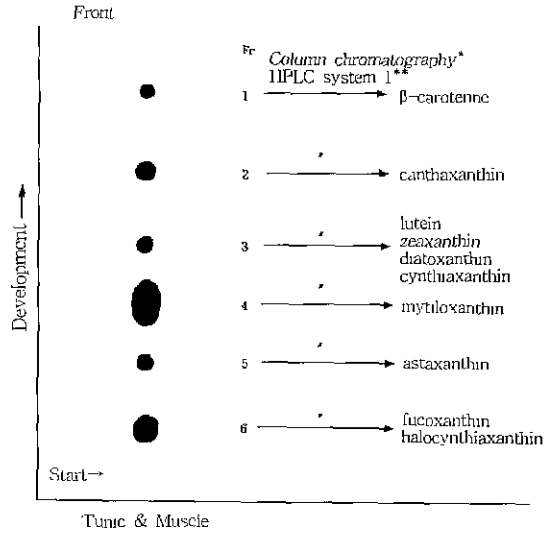


Fig. 1. Preparative thin-layer chromatogram of total carotenoids from tunicata, *Halocynthia hilgendorfi f. ritteri*.

Absorbent: Silicagel 60G

Developer: Petroleum ether : Acetone (70:30)

\*Column chromatography, MgO : celite 545 (1:1, w/w)

\*\*HPLC system 1, Sumichural OA-2000 column (4 mm i.d. x 250 mm)

Mobile phase, Hexane : Dichloromethane : Ethanol (48:16:1 2, v/v/v)

가 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum은  $\delta$  1.02s(6H, Me-16,16'), 1.05s(6H, Me-17,17'), 1.56s(3H, Me-18'), 1.84s(6H, Me-20,20'), 1.97s(6H, Me-19,19'), 6.1~6.7 m(ca 14H, conj. olefinic)의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub> 568 [M], 550 [M-18], 476 [M-92]의 peak가 확인되어 isozeaxanthin의 문헌치(42)와 일치하여 isozcaxanthin으로 동정하였다.

9-Cis-diatoxanthin : 2% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.이 다시 HPLC에 의해 분리된 이성체로서, 가시부 흡수 spectrum 측정 결과, 흡수 극대치가 420, 443, 470 nm(in p.e.), 420, 444, 470 nm(in ethanol), 439, 455, 480 nm(in chloroform), 438, 455, 489 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 420, 442, 470 nm(in p.e.)로서 1 nm blue shift하였고, IR spectrum의 측정 결과 diatoxanthin과 동일하게 나타났다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은  $\delta$  1.07s(6H, Me-16',17'), 1.19s(3H, Me-17), 1.73s(3H, Me-18'), 1.97s(6H, Me-18,19'), 1.99s(6H, Me-19,20), 4.01m(2H, Me-3,3'), 6.1~6.9 m(ca 12H, conj. olefinic H, 6.83dd(4H, Me-11))의 signal이 나타났으며, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub> 566 [M], 474 [M-92]의 peak가 확인되어 문헌치(43)와 비교하여 9-cis-diatoxanthin으로 동정하였다.

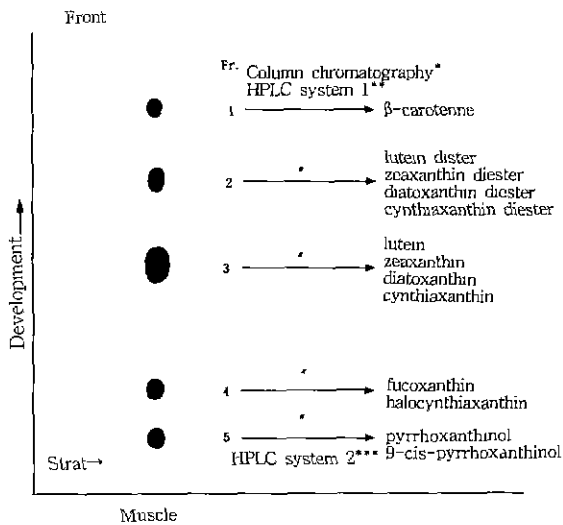


Fig. 2. Preparative thin-layer chromatogram of total carotenoids from shellfish, *Crassostrea gigas*.

Absorbent: Silicagel 60G

Developer: Petroleum ether : Acetone (70:30)

\*Column chromatography; MgO: celite 545 (1:1, w/w)

\*\*HPLC system 1, Sumichiral OA-2000 column (4 mm i.d.×250 mm)

Mobile phase; Hexane : Dichloromethane : Ethanol (48:16:1.2, v/v/v).

\*\*HPLC system 2 Chemcosorb 5CN column (4 mm i.d.×300 mm)

Mobile phase; Acetone : CH<sub>3</sub> CN (85:15, v/v)

9-Cis-cynthiaxanthin : 10% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.이 다시 HPLC에 의해 분리된 이성체로서, 가시부 흡수 spectrum 측정 결과, 흡수 극대치가 420, 443, 473 nm(in p.e.), 419, 445, 472 nm(in ethanol), 420, 455, 482 nm(in chloroform), 430, 456, 482 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 420, 443, 473 nm(in p.e.)로서 shift하지 않았고, IR spectrum의 측정 결과 cynthiaxanthin과 동일하게 나타났다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ1.14s(3H, Me-17'), 1.19s(3H, Me-17), 1.20s(3H, Me-16'), 1.25s(3H, Me-16), 1.92s(3H, Me-18'), 1.95s(3H, Me-19'), 1.97s(3H, Me-18), 2.00s(6H, Me-20,20'), 3.99 br s(2H, Me-3,3'), 6.15~6.9 m(ca 10H, olefinic H, 6.84dd(4H, Me-11))의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub> 564 [M], 472 [M-92]의 peak가 확인되어 문헌치(43)와 비교하여 9-cis-cynthiaxanthin으로 동정하였다.

Mytloxanthin : 30% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.으로서, 가시부 흡수 spectrum의 측정 결과, 흡수 극대치가 470 nm(in p.e.), 472 nm(in ethanol), 482 nm(in chloroform), 482 nm(in benzene)으로서 keto carotenoid 특유의 single band를 나타냈으며, NaBH<sub>4</sub>에 의한 환원 반응의 결과, 427, 454 nm(in p.e.)로서 β-carotene type의 흡수 극대치

를 나타냈다. IR spectrum의 측정 결과, Vmax 3500 cm<sup>-1</sup>(-OH), 2165 cm<sup>-1</sup>(-C≡C-)의 흡수대가 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ0.85s(3H, Me-16'), 1.14s(3H, Me-16), 1.19s(6H, Me-17,17'), 1.35s(3H, Me-18'), 1.92s(3H, Me-18) and 1.97s(12H, Me-19,20,19',20'), 6.0~7.0 m(ca. 10H, olefinic H)의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>40</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub> 598 [M], 580 [M-18] 및 565 [M-18-15] 및 506 [M-92]의 peak가 확인되어 문헌치(42)와 비교하여 mytloxanthin으로 동정하였다.

Fucoxanthin : 40% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.으로서, 가시부 흡수 spectrum의 측정 결과, 흡수 극대치가 444, 470 nm(in p.e.), 445, 470 nm(in ethanol), 457, 482 nm(in chloroform), 459, 483 nm(in benzene)로서 β-carotene type의 흡수 spectrum을 나타냈으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 444, 470 nm(in p.e.)로서 2 nm blue shift하였다. IR spectrum의 측정 결과, Vmax 1930 cm<sup>-1</sup>(>C=C<)의 흡수대가 나타났으며, 참명계의 포피(44)로부터 추출한 포피 fucoxanthin과 co-TLC 및 co-HPLC 한 결과 단일대가 얻어져 fucoxanthin으로 동정하였다.

Halocynthiaxanthin : 60% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.으로서, 가시부 흡수 spectrum의 측정 결과, 흡수 극대치가 430, 452, 470 nm(in p.e.), 430, 453, 470 nm(in ethanol), 442, 465, 482 nm(in chloroform), 444, 455, 483 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 423, 444.5, 462 nm(in p.e.)로서 7.5 nm blue shift하였고, conc. HCl에 의한 epoxide test 결과 양성으로 나타났다. IR spectrum의 측정 결과, Vmax 1657 cm<sup>-1</sup>(-C=O), 2165 cm<sup>-1</sup>(-C≡C-)의 흡수대가 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ 0.96s(3H, Me-16), 1.03s(3H, Me-17), 1.22s(3H, Me-18), 1.92s(6H, Me-19,18'), 1.20s(3H, Me-16'), 1.14s(3H, Me-17'), 1.99s(9H, Me-20,20',19'), 2.59 and 3.66(both d, 1H each, 7-CH<sub>2</sub>), 6.0~7.0 m(ca. 10H, olefinic H)의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>40</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub> 598 [M], 580 [M-18], 565 [M-18-15] 및 506 [M-92]의 peak가 확인되어 halocynthiaxanthin의 문헌치(42)와 일치하여 halocynthiaxanthin으로 동정하였다.

9-Cis-halocynthiaxanthin : 60% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.이 다시 HPLC(Sumichiral OA-2000 column)에 의해 분리된 이성체로서, 가시부 흡수 spectrum 측정 결과, 흡수 극대치가 424, 446, 465 nm(in p.e.), 424, 447, 465 nm(in ethanol), 435, 459, 477 nm(in chloroform), 437, 461, 487 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 424, 445, 465 nm(in p.e.)로서 1 nm blue shift하였고, IR spectrum의 측정 및 epoxide test 결과 halocynthiaxanthin과 동일하게 나타났다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ 0.96s(3H, Me-

16), 1.03s(3H, Me-17), 1.22s(3H, Me-18), 1.94s(6H, Me-19,18'), 1.19s(3H, Me-16'), 1.24s(3H, Me-17'). 1.99s(9H, Me-20,20',19'), 2.59 and 3.66(both d, 1H each, 7-CH<sub>2</sub>), 6.0~7.0 m(ca. 10H, olefinic H, 6.84dd(4H, Me-11))의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정결과, C<sub>40</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub> 598 [M<sup>+</sup>]의 peak가 확인되어 문헌치(43)와 비교하여 9'-cis-halocynthiaxanthin으로 동정하였다.

Pyrrhoxanthinol : 70% MeOH/acetone으로 용출된 Fr 으로서, 가시부 흡수 spectrum의 측정 결과, 흡수 극대치가 459, 488 nm(in p.e), 459, 488 nm(in ethanol), 469, 497 nm(in chloroform), 470, 498 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 454, 485 nm(in p.e)로서 5 nm blue shift하였다. IR spectrum의 측정 결과, V<sub>max</sub> 3300 cm<sup>-1</sup>(-OH), 2165 cm<sup>-1</sup>(-C≡C-)의 흡수대가 나타났으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ 0.98s(3H, Me-17'), 1.15s(3H, Me-17), 1.20s(9H, Me-16,16',15'), 1.92s(3H, Me-18), 2.01s(3H, Me-19), 2.23s(3H, Me-19), 3.91 br s(1H, Me-3'), 3.99 br s(Me-3), 5.74~7.17 m(ca. 10H, olefinic H)의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub> 570 [M<sup>+</sup>], 552 [M-18], 478 [M-92]의 peak가 확인되어 pyrrhoxanthinol의 분자량과 일치하여 pyrrhoxanthinol로 동정하였다.

9-Cis-pyrrhoxanthinol : 70% MeOH/acetone으로 용출된 Fr.이 다시 HPLC(Chemcosorb 5CN column)에 의해 분리된 이성체로서, 가시부 흡수 spectrum의 측정 결과, 흡수 극대치가 453, 482 nm(in p.e), 454, 482 nm(in

ethanol), 465, 492 nm(in chloroform), 466, 492 nm(in benzene)로 나타났으며, I<sub>2</sub>에 의한 이성화 반응 생성물의 가시부 흡수 spectrum은 448, 479 nm(in p.e)로서 5 nm blue shift하였고, IR spectrum의 측정 결과, pyrrhoxanthinol과 동일하게 나타났다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 δ 0.98s(3H, Me-17'), 1.19s(3H, Me-18), 1.20s(6H, Me-15',16'), 1.25s(3H, Me-16), 1.97s(3H, Me-18), 2.00s(3H, Me-19), 2.23s(3H, Me-20'), 3.91 br s(1H, Me-3'), 4.01 br s(1H, Me-3), 5.74~7.17 m(ca. 10H, olefinic H, 6.84 dd(1H, Me-11),)의 signal이 나타났고, Mass spectrum의 측정 결과, C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub> 570 [M<sup>+</sup>], 552 [M-18], 478 [M-92]의 peak가 확인되어 9-cis-pyrrhoxanthinol의 분자량과 일치하여 9-cis-pyrrhoxanthinol로 동정하였다.

#### 멍게류의 carotenoid 조성

본 실험에 사용된 멍게류의 총 carotenoid 함량과 분리, 동정된 각 carotenoid 조성은 Table 2와 같다. 총 carotenoids 함량은 표피의 경우, 붉은멍게(30.96 mg%), 참멍게(9.97 mg%), 미더덕(4.89 mg%), 이가보야 개멍게(2.53 mg%), 리베크 개멍게(2.33 mg%) 및 흑미더덕(1.15 mg%)의 순으로, 육에서는 붉은멍게(18.65 mg%), 미더덕(6.45 mg%), 참멍게(4.80 mg%), 이가보야 개멍게(털멍게)(4.07 mg%), 리테르 개멍게(3.36 mg%) 및 흑미더덕(2.39 mg%)의 순으로 함유하였으며, 이는 다른 미색동물(41,45)의 총 carotenoid 함량과 비교하여 유사하였다. 한편, 참멍게와 붉은멍게는 표피의 총 carotenoid 함량이

Table 2. Amount and percentage composition of individual carotenoid in tunicata

Carotenoids	Species of tunicates <sup>1)</sup>		Composition (%)									
			Tunic					Muscle				
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
β-Carotene	10.6	17.6	5.9	9.9	5.0	6.6	12.6	21.2	7.7	17.5	12.7	9.3
Isocryptoxanthin												
β-Cryptoxanthin				3.7					5.3	11.8		
Canthaxanthin						17.1	6.7				19.6	5.0
Lutein	0.6					0.8					1.9	
Zeaxanthin	5.1	5.1	1.8	2.1	1.1	1.9	10.0	4.7		1.3		3.0
Diatocanthin	13.5	14.5	10.6	8.4	4.3	3.8	11.6	18.7	8.3	6.6	7.9	4.1
Cynthiaxanthin	34.6	37.4	20.9	27.4	21.3	14.5	25.1	25.5	12.2	26.5	15.4	21.8
9-Cis-diatocanthin			3.9			5.4		1.4	0.7	2.3		0.9
9-Cis-cynthiaxanthin			2.6	10.7				4.9	2.2	2.4		2.7
(3R, 3'R)-Astaxanthin	5.2		5.9	5.4	9.7	10.0	4.8		5.9	0.4	11.1	
(3S, 3'S)-Astaxanthin	5.8		7.5	6.7	7.2	8.3	6.1	4.2	7.0	2.2	11.5	
Mytiloxanthin			3.7	2.2	14.0	18.5	5.1	1.6	3.7	1.9	6.0	3.3
Fucoxanthin			16.4	1.6	7.6	23.0						26.6
Halocynthiaxanthin	17.1		15.5	15.1	1.3	1.8	12.6	9.7	26.3	16.2	14.8	15.2
9-Cis-halocynthiaxanthin								0.5	0.3	2.3	1.0	2.9
Unidentified carotenoids	7.5	6.8	11.8	15.3	10.6	4.9	12.1	12.8	10.3	8.9	8.6	8.8
Total carotenoid (mg%)	9.97	30.96	1.15	4.89	2.33	2.53	4.80	18.65	2.39	6.45	3.36	4.07

<sup>1)</sup>1, *Halocynthia roretzi* 2; *Halocynthia aurantium* 3; *Styela plicata* (LESUEUR) 4, *Styela clava* (HERDMAN) 5; *Halocynthia hilgendorfi* f. *ritteri* and 6, *Halocynthia hilgendorfi* f. *igaboya*

육보다 높은 반면 미더덕, 흑미더덕, 이가보야 개명게 및 리테르 개명게는 육의 총 carotenoid 함량이 표피보다 다소 높게 나타나 특이하였다.

참명게의 carotenoid 조성비는 표피와 육에서 cynthiaxanthin(34.6%, 25.1%), halocynthiaxanthin(17.1%, 12.6%), diatoxanthin(13.5%, 11.6%) 및  $\beta$ -carotene(10.6%, 12.6%)이 주성분을 이루고, 그 외 (3S,3'S)-astaxanthin, (3R,3'R)-astaxanthin, zeaxanthin, lutein, mytiloxanthin, 9-cis-cynthiaxanthin 및 9-cis-diatoxanthin 등이 소량으로 함유하였으며, 육과 표피의 carotenoids 조성은 서로 유사하였다. 다만 육에는 표피에 없는 9-cis-diatoxanthin, 9-cis-cynthiaxanthin 및 mytiloxanthin을 함유하여 상이하였다.

붉은명게의 carotenoid 조성비는 표피와 육에서 cynthiaxanthin(37.4%, 25.5%),  $\beta$ -carotene(17.6%, 21.2%), diatoxanthin(14.5%, 18.7%) 및 halocynthiaxanthin(12.9%, 9.7%)이 주성분을 이루고, 그 외 zeaxanthin, (3R, 3'R)-astaxanthin, (3S,3'S)-astaxanthin, 9-cis-cynthiaxanthin, 9-cis-diatoxanthin 및 9-cis-halocynthiaxanthin 등이 소량으로 함유하였으며, 육과 표피의 carotenoids 조성은 서로 유사하였다. 다만 참명게에서처럼 육에는 표피에 없는 9-cis-diatoxanthin, 9-cis-cynthiaxanthin 및 mytiloxanthin을 함유하여 상이하였다.

흑미더덕의 carotenoid 조성비는 표피와 육에서 cynthiaxanthin(20.9%, 42.2%), halocynthiaxanthin(15.5%, 26.3%) 및 diatoxanthin(10.6%, 8.3%)이 주성분을 이루고, 그 외 (3S,3'S)-astaxanthin, (3R,3'R)-astaxanthin,  $\beta$ -carotene, 9-cis-diatoxanthin, mytiloxanthin, 9-cis-cynthiaxanthin 및 9'-cis-halocynthiaxanthin 등이 소량으로 함유하였으며, 육과 표피의 carotenoids 조성은 서로 유사하였다. 다만 표피에는 육에 없는 상대함량이 높은 fucoxanthin을 함유하는 것이 상이하였다.

미더덕의 carotenoid 조성비는 표피와 육에서 cynthiaxanthin(27.4%, 26.5%), halocynthiaxanthin(15.1%, 16.2%)이 주성분을 이루고, 그 외 9-cis-diatoxanthin,  $\beta$ -carotene, diatoxanthin, (3S,3'S)-astaxanthin, (3R,3'R)-astaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, mytiloxanthin, zeaxanthin 및 9'-cis-halocynthiaxanthin 등이 소량으로 함유하였으며, 육과 표피의 carotenoids 조성은 서로 유사하였다. 다만 표피에는 육에는 없는 상대함량이 높은 9-cis-cynthiaxanthin을 함유하는 것이 상이하였다.

리테르 개명게의 carotenoid 조성비는 표피와 육에서 cynthiaxanthin(21.3%, 15.4%) 및 canthaxanthin(17.1%, 19.6%)이 주성분을 이루고, 그 외 mytiloxanthin, (3R,3'R)-astaxanthin, (3S,3'S)-astaxanthin, fucoxanthin, 9-cis-diatoxanthin,  $\beta$ -carotene, diatoxanthin, halocynthiaxanthin, zeaxanthin, lutein, 9-cis-cynthiaxanthin 및 9'-cis-halocynthiaxanthin 등이 소량으로 함유하였으며, 육과

표피의 carotenoids 조성은 서로 유사하였다. 다만 흑미더덕에서처럼 표피에는 육에 없는 fucoxanthin을 함유하여 상이하였다.

이가보야 개명게의 carotenoid 조성비는 표피와 육에서 fucoxanthin(23.0%, 26.6%), mytiloxanthin(18.5%, 3.3%) 및 cynthiaxanthin(14.5%, 21.8%)이 주성분을 이루고, 그 외 (3R, 3'R)-astaxanthin, (3S,3'S)-astaxanthin, canthaxanthin,  $\beta$ -carotene, diatoxanthin, zeaxanthin, halocynthiaxanthin, 9'-cis-halocynthiaxanthin, 9-cis-diatoxanthin 및 9-cis-cynthiaxanthin 등이 소량으로 함유하였으며, 육과 표피의 carotenoids 조성은 서로 유사하였다. 다만 표피에는 육에는 없는 astaxanthin을 함유하는 것이 상이하였다.

참명게와 붉은명게의 carotenoids 조성은 Matsuno 등(44) 및 Ookubo와 Matsuno(45)가 보고한 참명게(*H. roretzi*)의 carotenoid 조성과 비교하여 cynthiaxanthin(alloxanthin)과 halocynthiaxanthin이 주성분으로 나타났다는 유사하였으나, 주성분으로 함유된 mytiloxanthinone이 본 실험에서는 검출되지 않아 상이하였다. 또한 흑미더덕과 미더덕의 carotenoids 조성은 Ookubo와 Matsuno(45)가 보고한 흑미더덕(*Stylea plicata*)과 미더덕(*Stylea clava*)의 carotenoid 조성과 비교하여 유사하였으나, 주성분으로 함유된 fucoxanthinol과 mytiloxanthinone이 본 실험에서는 검출되지 않아 상이하였다. 한편, 리테르 개명게의 carotenoids 조성에서 canthaxanthin이 주성분으로 분리, 동정되었는데, 이는 성게류(Echinoidea)(46) 및 해삼류(Aspidochirota)(47)에서 canthaxanthin이 주성분으로 존재하는 것과 비교할 수 있었다. 또한 이가보야 개명게의 carotenoids 조성에서 fucoxanthin이 주성분으로 분리, 동정된 것은 Ookubo와 Matsuno(45)가 미색동물에는 fucoxanthin이 주성분으로 존재한다는 것과 비교하여 유사하였다.

#### 패류의 carotenoid 조성

본 실험에 사용된 패류의 총 carotenoid 함량과 분리, 동정된 각 carotenoid 조성은 Table 3과 같다. 총 carotenoid 함량은 키조개 난소(6.83 mg%), 비단조개 육(6.53 mg%), 제철 육(3.44 mg%), 비단가리비 난소(2.51 mg%), 다슬기 육(1.20 mg%), 꼬끼리조개 난소(0.50 mg%), 코고동 육(0.38 mg%), 굴 육(0.35 mg%) 및 백합 육(0.32 mg%)의 순으로 함유하였다. 이는 다른 패류 즉, 가리비(*Patinopecten yessoensis*)(16), 피조개(*Scapharca broughtonii*), 새꼬막(*S. subcrenata*), 꼬막류(*S. satowi*), 큰이랑피조개(*S. globosa ursus*)(15), 홍합(*Mytilus coruscus*)(14), 나시류의 군소(*Aplysia kurodai*)(48) 그리고 긴빨고둥 육(*Fusinus perplexus*)(49)들과 비교하여 비단조개 육, 키조개 난소, 비단가리비 난소 및 제철 육의 총 carotenoid 함량

Table 3. Amounts and percentage composition of individual carotenoid in shellfishes

Carotenoids	Species of shellfishes <sup>1)</sup>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\beta$ -carotene	34.8	12.1	10.7	3.4	23.7	14.9	8.0	8.9	34.1
Isocryptoxanthin									
Lutein diester		5.5	1.8						
Zeaxanthin diester		3.0	7.3						
Diatoxanthin diester		2.6	5.0						
Cynthiaxanthin diester		2.4	2.0						
Canthaxanthin	17.7			60.6					
Isozeaxanthin				20.5					
Lutein		23.2	4.5		10.5	6.5			5.9
Zeaxanthin	18.2	7.3	13.6		20.4	6.7	3.1	9.6	4.4
Diatoxanthin	2.3	8.7	3.8		8.8		4.2	8.6	
Cynthiaxanthin	2.1	8.9	15.9		6.8	48.6	21.5	39.0	8.7
9-Cis-diatoxanthin			5.6				1.0		
Mytiloxanthin		6.0		4.5	4.0	14.6	14.6	3.8	26.4
Fucoxanthin	10.7	7.9	5.6		6.8	6.0			6.8
Halocynthiaxanthin	8.4			8.5	7.0	5.8	8.4	10.3	
9-Cis-Halocynthiaxanthin									
Pyrrhoxanthinol		3.8	2.9		4.8	3.8	2.0	4.1	
9-Cis-pyrrhoxanthinol		1.3	1.1		1.2	1.3	0.5	1.4	
(3R, 3'R)-Astaxanthin							5.5	6.3	3.0
(3S, 3'S)-Astaxanthin							6.5	7.2	2.0
Unidentified carotenoids	5.8	7.3	6.2	2.5	6.0	3.9	9.4	0.8	10.7
Total carotenoid (mg%)	1.20	0.33	0.35	6.53	0.32	3.44	6.83	2.51	0.50

<sup>1)</sup> 1, *Semisulcospira libertina* 2; *Buccinum (Volutharpa) perryi* (JAY) 3, *Crassostrea gigas* 4; *Peronidia venulosa* (Schrenck) 5; *Meretrix lusoria* 6; *Corbicula fluminea* 7; *Atrina pinnata* 8; *Chlamys farreri* and 9; *Panope japonica*

이 매우 높았으며, 총 carotenoids의 급원으로도 이용될 수 있다고 생각되며, 그 외는 유사한 함량치를 보였다.

패류의 carotenoid 조성은, 다슬기 육에서  $\beta$ -carotene (34.8%), zeaxanthin(18.2%) 및 canthaxanthin(17.7%)이 주성분을 이루고 그 외 fucoxanthin, halocynthiaxanthin, diatoxanthin 및 cynthiaxanthin의 순으로 함유하며, 코고둥 육에서 cynthiaxanthin(24.2%), zeaxanthin(21.9%) 및 isocryptoxanthin(20.4%)이 주성분을 이루고 그 외  $\beta$ -carotene, diatoxanthin, pyrrhoxanthinol 및 9-cis-pyrrhoxanthinol의 순으로 함유하였다.

굴 육에서 cynthiaxanthin(15.9%), zeaxanthin(13.6%) 및  $\beta$ -carotene(10.7%)이 주성분을 이루고 그 외 zeaxanthin diester, 9-cis-diatoxanthin, fucoxanthin, diatoxanthin diester, lutein, diatoxanthin, pyrrhoxanthinol 및 cynthiaxanthin diester의 순으로 함유하며, 비단조개 육에서 canthaxanthin(60.6%) 및 isozeaxanthin(20.5%)이 주성분을 이루고 그 외 halocynthiaxanthin, mytiloxanthin 및  $\beta$ -carotene의 순으로 함유하였다.

백합 육에서  $\beta$ -carotene(23.7%) 및 zeaxanthin(20.4%)이 주성분을 이루고 그 외 lutein, diatoxanthin, halocynthiaxanthin, cynthiaxanthin, pyrrhoxanthinol, mytiloxanthin 및 9-cis-pyrrhoxanthinol의 순으로 함유하며, 채첩육에서 cynthiaxanthin(48.6%),  $\beta$ -carotene(14.9%) 및

mytiloxanthin(14.6%)이 주성분을 이루고 그 외 zeaxanthin, lutein, fucoxanthin, halocynthiaxanthin, pyrrhoxanthinol 및 9-cis-pyrrhoxanthinol의 순으로 함유하였다.

키조개 난소에서 cynthiaxanthin(21.5%) 및 mytiloxanthin(14.6%)이 주성분을 이루고 그 외 halocynthiaxanthin,  $\beta$ -carotene, (3S, 3'S)-astaxanthin, (3R, 3'R)-astaxanthin, diatoxanthin, zeaxanthin, pyrrhoxanthinol, 9-cis-diatoxanthin 및 9-cis-pyrrhoxanthinol의 순으로 함유하며, 비단가리비 난소에서 cynthiaxanthin(39.0%) 및 halocynthiaxanthin(10.3%)이 주성분을 이루고 그 외 zeaxanthin,  $\beta$ -carotene, diatoxanthin, (3S, 3'S)-astaxanthin, (3R, 3'R)-astaxanthin, pyrrhoxanthinol, mytiloxanthin 및 9-cis-pyrrhoxanthinol의 순으로 함유하였다.

그리고 꼬끼리조개 난소에서는  $\beta$ -carotene(34.1%) 및 mytiloxanthin(26.4%)이 주성분을 이루고 그 외 cynthiaxanthin, fucoxanthin, lutein, zeaxanthin, (3R, 3'R)-astaxanthin 및 (3S, 3'S)-astaxanthin의 순으로 함유하여, 패류의 carotenoids 조성은 서식환경이 다른 것처럼 전체적으로 매우 서로 상이하였다.

이러한 결과는 홍합(*Mytilus coruscus*)의 육(50) 및 진주담치(*Mytilus edulis*)의 육(50), 큰가리비(*Patinopecten yesoensis*)의 난소(16)의 carotenoids 조성과의 비교하여 다소 상이하였으며, 굴육에 monoester 및 diester형 carotenoid



ids가 유리형 carotenoids와 혼합하여 존재한다는 것은 피조개(*S. broughtonii*), 꼬막류(*S. satoui*), 새꼬막(*S. subcrenata*) 그리고 큰이랑피조개(*S. globosaurus*)(15)와 비교하여 유사한 결과였다.

#### 주요 carotenoid의 돌연변이 유발 억제 효과

명게류와 패류에서 분리한 주요 carotenoids의 Ames test에 의한 돌연변이 유발 억제 활성은 Table 4와 같다. 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ)에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA 98에 대한 carotenoids의 효과는 20, 50 그리고 100 µg 투여시 농도증가에 비례하여 astaxanthin 첨가구에서 72.8~87.4%, isozeaxanthin 첨가구에서 56.0~67.3%, mytiloxanthin 첨가구에서 51.5~69.3% 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서 49.7~77.5% 범위에서 유의적으로 돌연변이 유발이 억제되었으며, 그 외 20 µg의 농도에서는 β-carotene 첨가구에서 86.1%, canthaxanthin 첨가구에서 68% 그리고 50 µg의 농도에서는 cynthiaxanthin 첨가구에서 66.5%의 억제효과가 나타났다. 또한 AFB<sub>1</sub>에 의해 유도된 *S. typhimurium* TA 98에 대한 carotenoids의 효과는 농도증가에 비례하여 β-carotene 첨가구에서 45.2~55.9%, isozeaxanthin 첨가구에서 54.8~73.0%, cynthiaxanthin 첨가구에서 38.8~71.6%, mytiloxanthin 첨가구에서 51.6~69.5% 범위에서 유의적으로 돌연변이 유발이 억제되었으며, 그 외 20 µg의 농도에서는 halocynthiaxanthin 첨가구에서 52.9%, canthaxanthin 첨가구에서 51.5%, astaxanthin 첨가구에서

38.0%의 억제효과가 나타났다 위의 결과로 볼 때 carotenoids에 의한 돌연변이 유발 억제 활성은 AFB<sub>1</sub>보다 IQ에서 다소 높은 억제 효과를 보였다.

이상의 결과는, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(MNNG)과 benzo(a)pyrene(B(a)P)에 의해 돌연변이가 유도된 *S. typhimurium* TA 100은 β-carotene, 8'-apo-β-carotene-methylester, 8'-apo-β-carotenal 및 canthaxanthin으로 돌연변이 유발이 억제되었고(51), 3-amino-3,4-dimethyl-5-H-pyrido(4,3-b)indol(Trp-p-1)에 의해 돌연변이가 유도된 *S. typhimurium*(TA 1535/PSK 1002)은 retinol, retinol acetate, retinoic acid, canthaxanthin, β-carotene 및 retinol palmitate의 처리로 돌연변이 유도 유전자 umc C의 발현이 억제되었으며(52), AFB<sub>1</sub>과 1-nitropyrene(1-NP)에 의해 돌연변이가 유도된 *S. typhimurium* YG1024은 marigold로부터 분리된 lutein에 의해 돌연변이 유발이 억제되었고(53,54), 또한 AFB<sub>1</sub>에 의해 돌연변이가 유도된 *S. typhimurium*(TA 1535/PSK 1002)은 해태, *Porphyra tenera*의 추출물로 돌연변이 유도 유전자 umc C의 발현을 억제시켰다(55)는 보고와 비교하여 유사하였다.

#### 주요 carotenoid의 종양세포 증식 억제 효과

명게류와 패류에서 분리한 주요 carotenoids의 MTT assay에 의한 종양세포 증식 억제 활성은 Table 5와 같다. 자궁경암세포(HeLa)에 대한 carotenoids의 효과는 5, 10 및 20 µg 투여시 농도 증가에 비례하여 β-carotene 첨가구에서 43.5~67.6%, cynthiaxanthin 첨가구에서 56.5~

Table 4. The antimutagenic effects of several carotenoids isolated from the tunicates and shellfishes on the mutagenicities induced by IQ and AFB<sub>1</sub> in *Salmonella typhimurium* TA 98

Mutagen	Carotenoids							
	Adding amounts (µg)	β-Carotene	Canthaxanthin	Isozeaxanthin	Astaxanthin	Cynthiaxanthin	Mytiloxanthin	Halocynthiaxanthin
IQ	20	229 ± 1 <sup>1)</sup> (86.1) <sup>2)</sup>	532 ± 28 (68.0)	723 ± 10 <sup>0.3)</sup> (56.0)	447 ± 20 <sup>n)</sup> (72.8)	652 ± 13 <sup>d)</sup> (60.3)	797 ± 13 <sup>a)</sup> (51.5)	826 ± 21 <sup>o)</sup> (49.7)
	50	244 ± 20 (85.4)	650 ± 11 (60.2)	620 ± 23 <sup>b)</sup> (62.5)	357 ± 5 <sup>b)</sup> (78.6)	551 ± 6 <sup>b)</sup> (66.5)	619 ± 25 <sup>a)</sup> (62.7)	600 ± 18 <sup>l)</sup> (63.5)
	100	451 ± 21 (73.3)	713 ± 24 (57.3)	538 ± 20 <sup>c)</sup> (67.3)	207 ± 12 <sup>c)</sup> (87.4)	914 ± 8 (46.1)	505 ± 23 <sup>c)</sup> (69.3)	369 ± 22 <sup>c)</sup> (77.5)
AFB <sub>1</sub>	20	400 ± 15 <sup>a)</sup> (45.2)	353 ± 19 <sup>a)</sup> (51.5)	330 ± 18 <sup>a)</sup> (54.8)	469 ± 35 <sup>d)</sup> (38.0)	447 ± 20 <sup>a)</sup> (38.0)	353 ± 12 <sup>a)</sup> (51.6)	344 ± 20 (52.9)
	50	388 ± 5 <sup>a)</sup> (47.1)	334 ± 13 <sup>a)</sup> (54.8)	254 ± 15 <sup>b)</sup> (65.0)	454 ± 20 <sup>a)</sup> (39.1)	357 ± 5 <sup>b)</sup> (51.5)	309 ± 20 <sup>b)</sup> (57.1)	349 ± 14 (51.8)
	100	322 ± 7 <sup>b)</sup> (55.2)	333 ± 23 <sup>a)</sup> (55.2)	197 ± 8 <sup>c)</sup> (73.0)	655 ± 27 (10.8)	207 ± 12 <sup>c)</sup> (71.6)	223 ± 22 <sup>c)</sup> (69.5)	361 ± 12 (50.3)

<sup>1)</sup>Each value represents the mean ± S.D. of three plates.

<sup>2)</sup>The values in parentheses are the inhibition rate (%)

IQ revertants, 1643 ± 36, Spontaneous revertants, 23 ± 4

AFB<sub>1</sub> revertants, 730 ± 11, Spontaneous revertants; 23 ± 2

<sup>3)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

73.9%, astaxanthin 첨가구에서 47.1~69.8% 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서 63.3~88.5%의 범위에서 유의적으로 암세포 증식이 억제되었으며, 그 외 20 µg의 농도에서는 mytiloxanthin 첨가구에서 81.3%, canthaxanthin 첨가구에서 51.0% 그리고 isozeaxanthin 첨가구에서 33.6%로 억제효과가 나타났다.

위암세포(NCI-H87)에 대한 carotenoid의 효과는 농도 증가에 비례하여 β-carotene 첨가구에서 37.6~56.2%, astaxanthin 첨가구에서 54.3~88.1%, cynthiaxanthin 첨가구에서 45.0~66.8% 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서 47.2~70.8%의 범위에서 유의적으로 암세포 증식이 억제되었으며, 그 외 20 µg의 농도에서는 mytiloxanthin 첨가구에서 73.6%, isozeaxanthin 첨가구에서 33.0%로 억제효과가 나타났다.

결장암세포(HT-29)에 대한 carotenoids의 효과는 농도 증가에 비례하여 β-carotene 첨가구에서 31.6~49.1%, cynthiaxanthin 첨가구에서 37.4~43.3%, mytiloxanthin 첨가구에서 48.8~79.8% 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서 32.3~39.5%의 범위에서 유의적으로 암세포 증식이 억제되었으며, 그 외 20 µg의 농도에서는 isozeaxanthin 첨가구에서 37.6% 그리고 astaxanthin 첨가구에서 46.0%로 억제효과가 나타났다.

골육암세포(MG-63)에 대한 carotenoids 효과는 농도 증가에 비례하여 β-carotene 첨가구에서 40.6~70.9%, cynthiaxanthin 첨가구에서 48.3~73.9%, astaxanthin 첨가구에서 54.5~77.3%, canthaxanthin 첨가구에서 54.4%~77.5% 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서 48.2~62.0%의 범위에서 유의적으로 암세포 증식이 억제되었으며, 그 외 20 µg의 농도에서는 mytiloxanthin 첨가구에서 63.3% 그리고 isozeaxanthin 첨가구에서 75.9%로 억제효과가 나타났다.

이상의 결과는 AFB<sub>1</sub>에 의해 유도된 오리의 말초 혈액 림프구의 세포상해는 β-carotene에 의해 억제되었으며(56), 인체의 결장암 세포인 DLD-1과 colo 320DM에 대하여 canthaxanthin, α-carotene 및 β-carotene은 강력한 증식 억제 활성을 보였고(57), 또한 해양생물 유래의 fucoxanthin과 halocynthiaxanthin 역시 각 종 종양세포 증식 억제 활성을 가진다는 보고(58)와 비교하여 유사하였다.

## 요 약

해양생물에 함유하는 특이한 carotenoids 조성과 이들 carotenoids의 생리활성을 밝히고자 미색동물 및 패류의 육과 표피에 존재하는 carotenoids 성분을 분리, 동정하였으며, 이들 marine carotenoids에 대한 돌연변이 유발 억제 및 종양세포 증식억제 활성을 비교, 검토한 결과는 다음과 같다. 멍게류의 총 carotenoids 함량은 육에서는 붉은멍게, 미더덕, 참멍게, 이가보야개멍게, 리테르개멍게 및 흑미더덕의 순으로 함유하였고(18.65~2.39 mg%), 미더덕 육이 참멍게 육보다 높게 나타나 특이하였으며, 붉은멍게, 참멍게 외는 육의 총 carotenoids 함량이 표피에 비해 높게 나타났다. 멍게류의 carotenoids 조성은 참멍게, 붉은멍게, 흑미더덕 그리고 미더덕에는 cynthiaxanthin(25.1~42.2%), halocynthiaxanthin(9.7~26.3%), diatoxanthin(8.0~18.7%) 및 β-carotene(7.7~21.2%)이, 리테르개멍게에는 canthaxanthin(19.6%), cynthiaxanthin(15.4%), halocynthiaxanthin(14.8%) 및 (3R, 3'R), (3S, 3'S)-astaxanthin(22.6%)이, 그리고 이가보야개멍게에는 fucoxanthin(26.6%), cynthiaxanthin(21.8%), halocynthiaxanthin(15.2%) 및 β-carotene(9.3%)이 주성분으로 함유하나, 멍게류의 carotenoids 조성은 전체적으로 서로 유사

Table 5. Inhibitory effect of several carotenoids isolated from the tunicates and shellfishes on the growth of human cancer cells (inhibition rate %)

Cancer cell	Adding amounts (µg)	Carotenoids							
		β-Carotene	Canthaxanthin	Isozeaxanthin	Astaxanthin	Cynthiaxanthin	Mytiloxanthin	Halocynthiaxanthin	
HeLa (Cervical carcinoma cell)	5	43.5±2.1 <sup>d1</sup>	33.1±3.1 <sup>d</sup>	15.1±4.7 <sup>d</sup>	47.1±3.4 <sup>d</sup>	56.5±0.4 <sup>a</sup>	68.3±0.1 <sup>a</sup>	63.3±3.3 <sup>a</sup>	
	10	54.8±1.7 <sup>b</sup>	42.2±2.5 <sup>ab</sup>	29.8±3.8 <sup>b</sup>	58.9±2.3 <sup>b</sup>	60.3±4.0 <sup>a</sup>	70.2±6.6 <sup>a</sup>	74.9±2.5 <sup>b</sup>	
	20	67.6±3.4 <sup>c</sup>	51.0±9.9 <sup>b</sup>	33.6±3.6 <sup>b</sup>	69.8±1.2 <sup>c</sup>	73.9±1.8 <sup>b</sup>	81.3±0.5 <sup>b</sup>	88.5±0.8 <sup>c</sup>	
NCI-H87 (Gastric carcinoma cell)	5	37.6±4.4 <sup>a</sup>	0	21.5±3.1 <sup>a</sup>	54.3±3.4 <sup>a</sup>	45.0±2.9 <sup>a</sup>	51.2±3.4 <sup>a</sup>	47.2±1.5 <sup>a</sup>	
	10	49.9±1.3 <sup>b</sup>	0	28.2±2.8 <sup>ab</sup>	65.3±1.7 <sup>b</sup>	54.0±0.4 <sup>b</sup>	68.9±2.2 <sup>b</sup>	58.3±1.5 <sup>b</sup>	
	20	56.2±2.6 <sup>c</sup>	0	33.0±3.5 <sup>b</sup>	88.1±1.2 <sup>c</sup>	66.8±2.3 <sup>c</sup>	73.6±1.5 <sup>b</sup>	70.8±4.4 <sup>c</sup>	
HT-29 (Colon carcinoma cell)	5	31.6±1.4 <sup>d</sup>	0	34.5±2.0 <sup>a</sup>	39.2±3.6 <sup>a</sup>	37.4±0.2 <sup>a</sup>	48.8±3.7 <sup>a</sup>	32.3±0.9 <sup>a</sup>	
	10	34.6±0.9 <sup>a</sup>	0	36.0±3.6 <sup>a</sup>	43.4±3.4 <sup>ab</sup>	39.3±2.6 <sup>ab</sup>	65.3±3.0 <sup>b</sup>	35.7±0.9 <sup>b</sup>	
	20	49.1±4.7 <sup>b</sup>	0	37.6±0.5 <sup>a</sup>	46.0±1.6 <sup>b</sup>	43.3±2.3 <sup>b</sup>	79.8±1.6 <sup>c</sup>	39.5±1.8 <sup>c</sup>	
MG-63 (Osteosarcoma carcinoma cell)	5	40.6±4.6 <sup>a</sup>	54.4±1.3 <sup>d</sup>	59.9±8.2 <sup>a</sup>	54.5±5.8 <sup>a</sup>	48.3±1.2 <sup>a</sup>	44.6±4.9 <sup>a</sup>	48.2±2.9 <sup>a</sup>	
	10	46.7±4.5 <sup>a</sup>	64.8±2.2 <sup>b</sup>	61.2±4.5 <sup>a</sup>	65.3±4.1 <sup>b</sup>	50.2±1.4 <sup>a</sup>	49.4±1.4 <sup>a</sup>	51.0±4.7 <sup>a</sup>	
	20	70.9±4.9 <sup>b</sup>	77.5±3.1 <sup>c</sup>	75.9±10.1 <sup>a</sup>	77.3±3.8 <sup>c</sup>	73.9±4.9 <sup>b</sup>	63.3±6.2 <sup>b</sup>	62.0±4.5 <sup>b</sup>	

<sup>1)</sup>Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

하였다. 그리고 멍게류의 육과 표피의 carotenoids 조성도 서로 유사하였다. 시료 패류중에서 비단조개 육, 키조개 난소, 비단가리비 난소 및 재첩 육의 총 carotenoids 함량(2.51~6.83mg%)이 다른 패류에 비해 매우 높았으며, 패류의 carotenoids 조성은 서식환경이 다른 것처럼 전체적으로 서로 상이하였다. 그러나 비단가리비 난소, 코고등 육 및 굴 육에는 cynthiaxanthin(15.9~39.0%), zeaxanthin(9.6~21.9%)이, 재첩 육과 키조개 난소에는 cynthiaxanthin(21.5~48.6%), mytiloxanthin(14.6%)이, 그리고 비단조개 육에는 canthaxanthin(60.6%), isozeaxanthin(20.5%)이, 이외 다슬기 육 및 백합 육에는  $\beta$ -carotene(23.7~34.8%) 및 zeaxanthin(18.2~20.4%)이 주성분으로 함유하였다. 또한 굴 육에는 dicster형 carotenoids가 유리형 carotenoids와 혼합되어 존재하는 것이 특이하였다. 한편, 멍게류 및 패류에서 분리한 주요 carotenoids의 돌연변이 유발억제 효과는 *S. typhimurium* TA 98에 대하여 20, 50 그리고 100  $\mu$ g 투여시 농도증가에 비례하여, IQ에서는 astaxanthin, isozeaxanthin, mytiloxanthin 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서, AFB<sub>1</sub>에서는  $\beta$ -carotene, isozeaxanthin 및 mytiloxanthin 첨가구에서 유의적으로 돌연변이 유발이 억제되었다. 또한, 멍게류 및 패류에서 분리한 주요 carotenoids의 종양세포증식억제 효과는 5, 10 그리고 20  $\mu$ g 투여시 농도증가에 비례하여, 자궁경암(HeLa)세포에서는  $\beta$ -carotene, cynthiaxanthin, astaxanthin 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서, 위암(NCI-H87)세포에서는  $\beta$ -carotene, astaxanthin, cynthiaxanthin 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서, 결장암(HT-29)세포에서는  $\beta$ -carotene, cynthiaxanthin, mytiloxanthin 및 halocynthiaxanthin 그리고 골육암(MG-63) 세포에서는  $\beta$ -carotene, cynthiaxanthin, astaxanthin, canthaxanthin 및 halocynthiaxanthin 첨가구에서 유의적으로 종양세포 증식이 억제되었다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

### 문헌

- Lönnerberg, E : Untersuchungen ber das vorkommen carotenoider stoffe bei mannen evertrebraten *Ark Zool.*, 22(A), 1-49 (1931)
- Lederer, E. ' Recherches sur les carotenoids des invertébrés. *Bull. Soc. Chim Biol.*, 20, 567-610 (1938)
- Nishibori, K : Studies on the pigments of marine animals VI. Carotenoids of some tunicates. *Publ. Seto. Mar Biol Lab.*, 7, 181-192 (1958)
- Tsuchiya, Y. and Suzuki, Y. ' Biochemical studies of the ascidian, *Cynthia roretzi* v. Drasche IV. Carotenoids in test *Tohoku J. Agric. Res.*, 10, 397-407 (1960)
- Matsuno, T and Ookubo, M. : A new carotenoid, halocynthiaxanthin from the sea squirt, *Halocynthia roretzi* *Tetrahedron Lett.*, 22, 4659-4660 (1981)
- Matsuno, T. and Ookubo, M. : A new marine carotenoid, mytiloxanthinone from the sea squirt, *Halocynthia roretzi* *Chem. Lett.*, 10, 1605-1606 (1982)
- Matsuno, T. and Sakaguchi, S. ' Isolation of peridinin from the sea squirt, *Botrylloides violaceus*, 'Itaboya' in Japanes. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 50, 1267 (1984)
- Matsuno, T., Ookubo, M and Komori, T : Carotenoids of tunicates III The structural elucidation of two new marine carotenoids, amarouciaxanthin A and B. *J. Natural Products*, 48, 606-613 (1985)
- Shimizu, T and Uchida, K. : Carotenoids in bivalves-I, Carotenoids in short-neck clam (in Japanese). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 34, 154-158 (1968)
- Shimizu, T and Monma, R. : Carotenoids in bivalves-II, Carotenoids in hard clam (in Japanese). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 34, 159-162 (1968)
- Shimizu, T. and Ohta, Y. : Carotenoids in bivalves-III, Carotenoids in corb shell (in Japanese) *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 34, 210-213 (1968)
- Shimizu, T and Narahara, T. ' Carotenoids in bivalves-IV, Carotenoids in ark-shell (in Japanese) *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 34, 503-506 (1968)
- Shimizu, T. and Oda, A. : Carotenoids in bivalves-V, Carotenoids in pecten (in Japanese) *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 34, 627-632 (1968)
- Matsuno, T and Maoka, T. : Isolation of a new carotenoid, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- $\beta$ -carotene from sea mussels. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47, 377-384 (1981)
- Matsuno, T and Maoka, T : Isolation of diatoxanthin, pectenoxanthin, pectenone and new carotenoid, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- $\beta$ -carotene from arkshell and related three species of bivalves *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 47, 495-499 (1981)
- Matsuno, T., Hiraoka, K. and Maoka, T : Carotenoids in the gonad of scallops (in Japanese). *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47, 385-390 (1981)
- Matsuno, T. ' New structures of carotenoids in marine animals. *Pure & Appl. Chem.*, 57, 639-666 (1985)
- Maria, M.V. and Fernando, S.M.  $\beta$ -carotene and cancer chemoprevention: from epidemiological association to cellular mechanism of action. *Nutrition Research*, 18, 1807-1824 (1998)
- Pung, A., Rundhaug, J.E, Yoshizawa, C.N. and Bertram, J.S  $\beta$ -Carotene and canthaxanthin inhibit chemically and physically induced neoplastic transformation in IOT1/2 cells *Carcinogenesis*, 9, 1533-1539 (1988)
- Chang, W.C, Lin, Y.L., Lee, M.J., Shiow, S.J and Wang, C.J : Inhibitory effect of crocetin on benzo(a)pyrene genotoxicity and neoplastic transformation in C3HIOT1/2 cells. *Anticancer Res.*, 16, 3603-3608 (1996)
- Wang, C.J, Cheng, T.C., Liu, J.Y., Chou, F.P., Kuo, M.L. and Lin, J.K. ' Inhibition of protein kinase C and proto-oncogene expression by crocetin in NIH/3T3 cells. *Mol. Carcinogenesis*, 17, 235-240 (1996)
- Tsushima, M., Maoka, T., Katsuyama, M., Kozuka, M., Matsuno, T., Tokuda, H., Nishino, H. and Iwashima, A. Inhibitory effect of natural carotenoids on Epstein-Barr virus activation activity of a tumor promoter in raji cells. A screening study for anti-tumor promoters *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 227-233 (1995)

23. Nishiwaki, R.M., Shidoji, Y., Nishiwaki, S., Yamada, T., Moriwaki, H. and Muto, Y.: Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes *Lipids*, **30**, 1029-1034 (1995)
24. Rock, C.L., Kushuska, R.A., Galvez, M.M. and Ethier, S.P.: Carotenoids induce morphological changes in human mammary epithelial cell cultures. *Nutr. Cancer*, **23**, 319-333 (1995)
25. Black, H.S. and Mathews-Roth, M.M.: Protective role of butylated hydroxytoluene and certain carotenoids in photocarcinogenesis (review article) *Photochem. Photobiol.*, **53**, 707-716 (1991)
26. Epstein, J.H.: Effect of  $\beta$ -carotene on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin (research note). *Photochem. Photobiol.*, **25**, 211-213 (1977)
27. Mathews-Roth, M.M.: Antitumor activity of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and phytoene. *Oncology*, **39**, 33-37 (1982)
28. Schwartz, J. and Shklar, G.: Regression of experimental oral carcinomas by local injection of  $\beta$ -carotene and canthaxanthin *Nutr. Cancer*, **11**, 35-40 (1988)
29. Gijarc, P.S., Rao, K.V.K. and Bhide, S.V.: Modulatory effects of snuff, retinoic acid and  $\beta$ -carotene on DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis in relation to keratin expression *Nutr. Cancer*, **14**, 253-259 (1990)
30. Santamaria, L., Bianchi, A., Arnaboldi, A., Ravetto, C., Bianchi, L., Pizzala, R., Andreoni, L., Santagati, G. and Bermond, P.: Chemoprevention of indirect and direct chemical carcinogenesis by carotenoids as oxygen radical quenchers. *Ann. NY Acad. Sci.*, **534**, 584-596 (1988)
31. Temple, N.J. and Basu, T.K.: Protective effect of  $\beta$ -carotene against colon tumors in mice *JNCI*, **78**, 1211-1214 (1987)
32. Narisawa, T., Fukaura, Y., Hasebe, M., Ito, M., Aizawa, R., Murakoshi, M., Uemura, S., Khachik, F. and Nishino, H.: Inhibitory effects of natural carotenoids,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Lett.*, **107**, 137-142 (1996)
33. Ha, B.S., Kweon, M.J., Park, M.Y., Baek, S.H., Kim, S.Y., Baek, I.O. and Kang, S.J.: Comparison of dietary carotenoids metabolism and effects to improve the body color of cultured fresh water fishes and marine fishes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 270-284 (1997)
34. Baek, S.H., Kim, S.Y., Geong, K.I., Kweon, M.J., Cho, O.S., Kim, J.H., Kim, H.S. and Ha, B.S.: Comparison of carotenoid pigments in Korean bitterling, *Cheilognathus signifer* and brnde bitterling, *Rhodeus ukekii* in the subfamily cyprinidae *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 1220-1225 (1999)
35. McBeth, J.W.: Carotenoid from nudibranchs *Comp. Biochem. Physiol.*, **41B**, 55-68 (1972)
36. Maron, K.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215 (1983)
37. Park, K.Y., Kim, S.H., Suh, M.J. and Chung, H.Y.: Inhibitory effects of garlic on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of HT-29 human colon carcinoma cells *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 370-374 (1991)
38. Lim, S.Y., Rhee, S.H., Yi, S.Y. and Park, K.Y.: Growth inhibitory effect and changes in membrane phospholipid fatty acid composition on MG-63 and AZ-521 human cancer cells by linoleic acid. *J. Korean Fish. Soc.*, **26**, 662-668 (1999)
39. Denizot, F. and Lang, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunological Methods*, **89**, 271-277 (1986)
40. Kim, H.S., Kim, Y.H., Cho, S.H. and Jo, J.Y.: Effect of dietary carotenoids on the nuptial color of bitterling (*Rhodeus uyekeu*) *J. Korean Fish. Soc.*, **32**, 276-279 (1999)
41. Kim, S.Y. and Ha, B.S.: Carotenoid pigments in echiurid, *Urechis Urucinctus* *J. Korean Fish. Soc.*, **32**, 223-231 (1999)
42. 津島己幸: 棘皮動物, 特にウニ類およびナマコ類のカロテノイドに関する比較生化学的研究. 京都薬科大学博士學位論文. p.1-128 (1995)
43. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H.: Spectroscopy. In *Carotenoids* Birkhauser, Vol. 1B, p.147-260 (1995)
44. Matsuno, T., Ookubo, M., Nishizawa, T. and Shuruzu, I.: Carotenoids of sea squirts. I. New marine carotenoids. Halocynthaxanthin and mytiloxanthinone from *Halocynthia roretzi*. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4309-4315 (1984)
45. Ookubo, M. and Matsuno, T.: Carotenoids of sea squirts-II. Comparative biochemical studies of carotenoids in sea squirts. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, 137-141 (1985)
46. Tsushima, M. and Matsuno, T.: Comparative biochemical studies of carotenoid in sea urchins-I. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B**, 801-810 (1990)
47. Matsuno, T. and Tsushima, M.: Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers. *Comp. Biochem. Physiol.*, **111B**, 597-605 (1995)
48. Yamashita, E. and Matsuno, T.: A new apocarotenoid from the sea hare *Aplysia kurodai* *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B**, 465-470 (1990)
49. Matsuno, T., Katagiri, K. and Maoka, T.: Carotenoids of the spindle shell *Fusinus perplexus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **54**, 1583-1588 (1984)
50. Kang, D.S. and Ha, B.S.: Carotenoid pigments of bivalves. 1. Composition of carotenoid pigments from muscle of mussel and blue mussel. *J. Korean Fish. Soc.*, **20**, 369-375 (1991)
51. Azuine, M.A., Goswami, U.C., Kayal, J.J. and Bhide, S.V.: Antimutagenic and anticarcinogenic effect of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr. Cancer*, **17**, 287-295 (1992)
52. Okai, Y., Higashi-Okai, K., Nakamura, S.-L., Yano, Y. and Otani, S.: Suppressive effects of retinoids, carotenoids and antioxidant vitamins on heterocyclic amine-induced UMU C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/PSK 1002) *Mutat. Res.*, **368**, 133-140 (1996)
53. Gonzalez de Mejia, E., Loarca-Pina, G. and Ramos-Gomez, M.: Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec Marigold (*Tagetes erecta*) against 1-nitropyrene *Mutat. Res.*, **389**, 219-226 (1997)
54. Gonzalez de Mejia, E., Ramos-Gomez, M. and Loarca-Pina, G.: Antimutagenic activity of natural xanthophylls against aflatoxin B<sub>1</sub> in *Salmonella typhimurium* *Environ. Mol. Mutagen.*, **30**, 346-353 (1997)
55. Okai, Y., Higashi-Okai, K., Nakamura, S., Yano, Y. and Otani, S.: Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (Asakusanori) *Cancer Lett.*, **100**, 235-240 (1996)
56. Cheng, Y.H., Pang, V.F., Cheng, Y.H. and Pang, V.F.: The cytotoxic effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on duck lymphocytes and the protective effect of beta-carotene *J. Chinese Soc.*

- Ani. Sci.*, 25, 195-207 (1996)
57. Onogi, N, Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Rutomi, Y., Moriwaki, H, Muto, Y. and Kojima, S. : Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutr. Cancer*, 32, 20-24 (1998)
58. Okuzumi, J . Antiproliferative and antitumor promoting activities of fucoxanthin, a natural carotenoid. *J. Kyoto Pref Univ. Med*, 100, 551-566 (1991)

(2000년 7월 28일 접수)