

다시마 푸코이단 추출물의 간독성에서 효소 조절 효능에 관한 연구

강금석 · 남천석 · 박은경¹ · 하배진*

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, ¹바이넥스 기업부설연구소

Received July 27, 2006 / Accepted August 18, 2006

The Enzymatic Regulatory Effects of *Laminaria japonica* Fucoidan Extract in Hepatotoxicity. Kum Suk Kang, Chun Suk Nam, Eun Kyung Park¹ and Bae Jin Ha*. *Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, 1-1 San, Gwaebup-dong, Sasang-gu, Busan, 617-736, Korea.* ¹*Central Research Institute, Binex Co., Ltd. 480-2, Jangrim-dong, Saha-gu, Busan, 604-846, Korea* – The purpose of this study was to investigate the effects of *Laminaria japonica* fucoidan extract (LJFE) through the enzymatic regulation against the hepatotoxicity-inducing carbon tetrachloride (CCl₄) in LJFE and CCl₄-treated rats. LJFE of 100 mg/kg concentration was intraperitoneally administered into rats at dose of 1.5ml/kg for 14 days. On the day 15, 3.3ml/kg of CCl₄ dissolved in olive oil (1:1) was injected 12 hours before anesthetization. We examined the levels of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) in serum of rats, superoxide dismutase(SOD) in mitochondrial fraction, and catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) in liver homogenate. CCl₄-treatment markedly increased the levels of GOT and GPT, and significantly decreased those of SOD, CAT and GPx. But LJFE pretreatment decreased the levels of GOT and GPT, by 40% and 64%, respectively and increased those of SOD, CAT and GPx, by 114%, 36.1% and 55.9%, respectively. These results showed the LJFE had the enzymatic regulatory effects against the hepatotoxicity-inducing CCl₄ in the preventive way.

Key words – *Laminaria japonica*, carbon tetrachloride, anti-oxidation enzyme, hepatotoxicity

서 론

다시마(*Laminaria japonica*)는 우리나라 해역에서 생산되는 대표적인 갈조류로 칼슘, 칼륨, 요오드, 아연 등 신체의 생리 대사에 관여하는 주요 무기질이 풍부하게 함유되어 있으며 [3] uronic acid로 구성된 alginic acid, 황산기를 함유하는 fucoidan[14] 및 laminaran[18]과 같은 식이섬유도 함유되어 있다. 이들 식이섬유는 비만을 예방, 치유하는 효과[6]가 있을 뿐만 아니라 당에 대한 내성을 증가시키며, 혈중 콜레스테롤을 저하하는 등의 지질대사를 개선함으로써 항 당뇨효과를 나타낸다[16]. 또 체내 축적된 유해 중금속을 방출함으로써 해독작용을 하며[15], 체내에서 나트륨을 칼륨으로 치환하여 나트륨의 과다흡수를 억제시킴으로서 고혈압 예방, 항암[25], 항 돌연변이[23], 항 바이러스[22] 등 다양한 효과가 보고되고 있다.

간 손상을 일으키는 물질에는 carbon tetrachloride (CCl₄), chloroform, phosphorus, dimethyl nitrosamine, thioacetamide 등이 있으며 형태학적인 급성 변화로 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽 중심성 괴사 등을 초래하고, 만성적으로는 간경변증 등을 일으킨다[2]. 대표적인 간 독성 물질중 하나인 CCl₄는 가장 강한 독성을 가진 물질이며 효소반응에 의해

trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals ($\cdot\text{OOCCL}_3$)을 생성하여 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격함으로써 지질이 산화되어 간 세포 용해를 일으킨다[5,20]. 이런 radicals는 세포소기관의 막 지질에 분포하는 불포화 지방산 측쇄의 methylene 결합을 공격하여 약물대사 효소 활성과 단백질 활성을 저하시키고 간에서의 급성 지방 변성을 일으키며 lipoprotein의 생성과 유리를 차단하여 급속한 지방축적을 야기한다[7]. 따라서 CCl₄는 radicals를 생성하고 그것으로 인하여 간세포의 지질막 등이 파괴되어 세포가 활동성을 잃게 되어 간 세포의 파괴로 이어지며 이것은 간 독성도와 비례하여 증가하는 것으로 파악된다.

간세포의 파괴, 과산화지질은 불포화지방산에서 일어나는 oxygen radicals에 의한 산화반응이며 oxygen radicals의 직접적인 작용보다는 철 이온 존재 하에 superoxide와 H₂O₂의 상호작용에 의해 형성되는 OH에 의해 간접적으로 일어나며, 이의 주된 손상장소가 DNA나 세포막이다[8]. 이와 같은 지질과산화는 여러 가지 독물에 의한 간 손상으로 이어지는 기전으로 인정되어진다[13].

Free radicals는 인체 내에서 강한 독성으로 작용하며 이런 radicals의 제거하는 인체방어기전으로 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등과 같은 항산화 효소와 그 외 환원형 보조인자들이 존재한다[11].

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5466, Fax : +82-51-999-5684

E-mail : bjha@silla.ac.kr

본 연구는 국내 해역에서 생산되는 대표적인 갈조류인 다시마에서 추출한푸코이단 추출물이 간독성에 대하여 활성을 가지는지를 간 독성 지표와 항산화효소 활성지표를 통해 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료

다시마는 (주)청호씨푸드에서 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 식이

실험동물은 체중 170~180 g 내외의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley계 생후 7주)를 대구 효창 사이언스로부터 제공받았고 7일 동안 적응시켰다. 실험동물은 cage에 각각 분리시키고 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동안 동물들은 22±1℃의 온도와 60±5% 상대습도로 유지시켰고 총 21마리의 흰쥐를 7마리씩 3군으로 나누었다(Table 1.). 정상군(NOR group)과 대조군(CON; CCl₄-treated group)은 0.9% saline을, 시료군(LFC; *Laminaria japonica* fucoidan extract and CCl₄-treated group)은 다시마 푸코이단 추출물(100 mg/kg)을 1.5 ml/kg씩 복강 내에 14일간 매일 투여하고 15일째 되는 날에 대조군과 시료군에서 실험동물의 간 손상을 유도하기 위해 CCl₄를 olive oil에 1:1 비율로 용해시켜 3.3 ml/kg의 용량을 복강 내로 투여하여 간 독성을 유발시켰다. CCl₄를 투여하고 절식시킨 뒤 12시간 후에 ether로 마취하고 희생시켜서 혈액을 채취하고 간을 적출하여 실험하였다.

푸코이단 추출

푸코이단은 Tako[28] 방법을 변형하여 추출하고 동결 건조하여 사용하였다.

혈액 채취 및 간 적출

시료 투여 기간 종료 후 실험동물을 ether 마취 하에서 심장에서 채혈하여 실온에서 30분 간 방치한 후 3000 rpm, 4℃에서

10분간 centrifuge하여 혈청을 분리하여 실험에 사용할 용량을 각각 분주하여 -70℃ deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였고, 간은 4엽을 전부 적출하여 0.9% 생리 식염수로 세척 여지로 흡착한 후 -70℃ deep freezer에 보관하여 실험에 사용하였다.

간 무게 10배의 solution (10 mM tris, 0.07 M saccharose, 0.1 mM EDTA, 0.2 M mannitol, in dissolved 0.1 N HCl)을 넣어 균질화한 후, 600 ×g, 4℃에서 10 min 원심분리한 상등액을 다시 8,000 ×g, 4℃에서 10 min 원심분리하여 얻은 pellet에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 5 ml 넣어 mitochondrial fraction으로 사용하였다.

혈청 중의 GOT, GPT 효소 level 측정

혈청 중의 GOT, GPT의 level은 Fuji dri-chem clinical chemistry analyzer (Fuji dri-chem 3500, Fujifilm, Japan)로 측정하였다.

간 조직의 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[19]에 의해서 750 nM에서 흡광도를 측정하고 표준 단백 시료를 bovine serum albumin (BSA)으로 정량하였다.

간 조직 내 mitochondria 분획의 superoxide dismutase (SOD) 효소활성 측정

Beauchamp와 Fridovich의 방법[4]에 따라 0.2 M K-phosphate buffer (pH 7.4)를 672 µl, 1 mM xanthine 100 µl, 1% sodium deoxychlorate 30 µl, 1.5 mM KCN 30 µl, 0.2 mM cytochrome C 150 µl를 넣은 혼합액에 sample 8 µl를 넣고, xanthine oxidase 원액 10 µl를 넣은 후 Elisa를 이용하여 550 nM에서의 흡광도 변화를 2 min 동안 측정하였다. 효소의 활성도는 표준액으로 Sigma사의 superoxide dismutase standard를 사용하여 측정하였다.

간 조직 중 catalase (CAT)의 활성 측정

Aebi의 방법[1]을 이용하여 phosphate buffer (0.05 M pH

Table 1. Experimental design of rats

Experimental group	Day 1-14	Day 15
	Dose of sample	Dose of sample
NOR (7)	1.5 ml/kg of 0.9% saline, i.p	1.5 ml/kg of 0.9% saline, i.p
CON (7)	1.5 ml/kg of 0.9% saline, i.p	3.3 ml/kg of CCl ₄
LFC (7)	1.5 ml/kg of <i>Laminaria japonica</i> fucoidan extract(100 mg/kg), i.p.	(dissolved in equal vol. olive oil,), i.p.

NOR : normal group
 CON : CCl₄-treated group
 LFC : *Laminaria japonica* fucoidan extract and CCl₄-treated group
 The number of experiment animals is given in parenthesis.
 CCl₄ : carbon tetrachloride i.p : intraperitoneally

7.0) 1.9 ml에 sample (homogenate와 mitochondrial fraction 을 800 ×g에서 20 min 원심분리한 상등액 100 µl를 buffer로 10, 20, 40, 80배 희석) 0.1 ml와 과산화수소 용액 1 ml를 혼합하여 240 nM에서 90 sec 동안 흡광도 감소를 측정 하였다.

간 조직 중 glutathione peroxidase (GPx)의 활성 측정

Lawrence등의 방법[17]에 준하여 0.1 M phosphate buffer (4 mM EDTA) 400 µl, 0.01 M NaN₃ 70 µl, 0.01 M GSH 70 µl, 1.5 mM NADPH 70 µl, H₂O 360 µl, GSSG-reductase (1.8 U/ml) 20 µl, sample 10 µl를 혼합하여 상온에서 1분간 방치 한 후 5 mM H₂O₂ 100 µl를 가해 잘 섞은 후 340 nM에서 90 sec 동안 흡광도 감소 측정을 하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 SPSS를 이용한 ANOVA로 검정하였다.

결과 및 고찰

간에 들어오는 모든 물질은 cytochrome P450 mono-oxygenase 와 NADPH-cytochrome P450 reductase의 효소 반응에 의해서 일차적으로 변환이 일어남으로써 독성물질이 되거나 무독성물질이 되어 인체에 영향을 미친다[31]. 생체에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진 하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과 호흡 등에 의해 그 양이 증가한다. 간 조직의 손상은 세포 내부에 존재하는 효소가 혈액으로 유출되는 것을 측정하거나 pericentral necrosis를 관찰함으로써 확인할 수 있다. 따라서 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소 활성도 측정은 간 손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나이다.

혈청 중 GOT 및 GPT의 효소 level의 변화

혈청 중 GOT와 GPT 효소 level의 상승은 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 level을 나타내는 것으로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 될 수 있다[10].

이 효소는 일반적으로 NH₄⁺로 전환하기 위해 여러 가지 아미노산에서 α-ketoglutarate까지 α-amino group들을 보낸다. GOT는 이 효소들 중에서 α-ketoglutarate에 aspartate의 amino group을 전달하는 촉매작용을 한다. GPT는 α-ketoglutarate에 alanine의 아미노기를 전달하는 촉매 작용을 한다[21].

CCl₄를 투여하면 혈청 GOT 및 GPT 효소 level이 증가하는 경향은 CCl₄에 의한 간 손상 유발물질이 간의 세포손상을 초래하였기 때문인 것으로 사료된다고 보고하고 있다[27].

Table 2. Effects of *Laminaria japonica* fucoidan extract on GOT, GPT levels in serum

Experimental group	GOT (U/l)	GPT (U/l)
NOR	92.5±5.50***	16.5±0.70***
CON	355±9.19	250±7.07
LFC	250±5.65***	78.5±4.94**

NOR : normal group
 CON : CCl₄-treated group
 LFC : *Laminaria japonica* fucoidan extract and CCl₄-treated group
 ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 values are mean ± SE (n=7).
 GOT : glutamate oxaloacetate transaminase GPT : glutamate pyruvate transaminase

Table 2와 같이 GOT의 경우 정상군에 비해 대조군에서 CCl₄의 간 장애 유발로 인해 효소 level이 약 3.8배 증가하였고 시료군인 LFC군과 대조군을 비교 하였을 때 40% 감소하여 다시마 푸코이단 추출물의 효과를 확인할 수 있었다. 역시 GPT level에 있어서도 CCl₄를 투여한 대조군이 정상군에 대해 약 11.5배정도 증가하여 간 장애 유발이 확인되었고 LFC 군이 대조군에 비해 64%로 감소하는 것으로 나타나 다시마 푸코이단 추출물의 효소 level 감소 효과를 확인할 수 있었다.

간 조직 및 mitochondrial fraction 중 SOD, CAT 및 GPx 측정

항산화계 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성 산소 종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며, 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있다고 보고하고 있다[9, 29]. 생체내의 항산화 방어기구 중에서 효소적 방어 계의 하나인 SOD 는 주로 mitochondria에 존재하며 superoxide radical을 환원하여 H₂O₂를 생성하여 생체를 보호한다[24, 26].

생체 내 생명 현상에서 필수적인 산화환원반응의 일종으로 생성되는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하는 효소 중 하나가 CAT이다. 이것은 다수의 H₂O₂ 생성효소들과 복합체를 형성하여 peroxisome에 주로 분포하며 H₂O₂ 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효과가 있다고 알려져 있다[12, 30].

Glutathione은 산화적인 손상으로부터 red cell을 보호한다. 그것은 disulfide bond에 의해서 연결된 두 개의 tripeptide에 의해서 환원된 형태(GSH)와 산화된 형태(GSSG) 사이를 순환한다. GSSG는 전자 근원과 같은 NADPH를 사용하는 flavoprotein인 glutathione reductase에 의해서 GSH로 환원된다. Glutathione은 aerobic life에서 해로운 부산물인 hydrogen peroxide와 organic peroxide와 함께 반응함으로써 해독 작용에서 중요한 역할을 수행한다. 이 반응에서 촉매 효소인 GPx는 selenium 원자가 공유 결합되어있는 것이 주목할 만하다. 이 효소는 H₂O₂와 lipid peroxide와 같은 peroxides의 다양한 종류들을 조절한다[17].

Table 3. Effects of *Laminaria japonica* fucoidan extract on SOD, CAT and GPx activities in liver homogenate and mitochondrial fraction

Experimental group	SOD	CAT	GPx
	(U/mg protein) mitochondrial fraction	(mU/mg protein) liver homogenate	(mU/mg protein) liver homogenate
NOR	131.12±2.20 ^{***}	344.34±5.16 ^{***}	29.82±2.86 ^{***}
CON	73.17±3.61	215.44±1.13	11.70±0.39
LFC	141.87±3.18 ^{**}	262.05±7.60 ^{***}	21.83±0.64 ^{**}

NOR : normal group

CON : CCl₄-treated group

LFC : *Laminaria japonica* fucoidan extract and CCl₄-treated group

^{***}p<0.001, ^{**}p<0.01 ^{*}p<0.05 values are mean ± SE (n=7).

SOD : superoxide dismutase CAT : catalase GPx : glutathione peroxidase

Table 3과 같이 간 조직에서의 SOD 활성정도는 대조군에서 정상군에 비해서 약 1.79배 정도로 낮게 나타났고 LFC군은 대조군에 비해 114%의 상승효과를 보였다. 또한 CAT의 활성도는 대조군에서 정상군에 비해 약 1.59배 감소를 보였으며 LFC군은 대조군보다 36.1% 높게 나타났다. GPx 활성도의 경우 대조군은 정상군에 비해 약 2.5배의 감소율을 보였으며 LFC군은 대조군에 비해서 55.9%의 증가율을 보였다.

요 약

다시마(*Laminaria japonica*)는 우리나라 해역에서 생산되는 대표적인 갈조류로 칼슘, 칼륨, 요오드, 아연 등 신체의 생리대사에 관여하는 주요 무기질이 풍부하게 함유되어 있으며, uronic acid로 구성된 alginic acid, 황산기를 함유하는 fucoidan 및 laminaran과 같은 식이섬유도 함유되어 있다. 다시마로부터 추출된 푸코이단의 항 간독성 효과를 확인하고자 흰쥐의 복강 내에 다시마 푸코이단 추출물을 14일간 투여하고 15일째 되는 날에 CCl₄를 투여한 후에 혈액 및 간 조직에서의 효소 활성의 변동을 통해 간독성에 대한 효과를 관찰하였다.

GOT의 경우 정상군에 비해 대조군에서 CCl₄의 간 장애 유발로 인해 효소 level이 약 3.8배 증가하였고 시료군인 LFC군과 대조군을 비교 하였을 때 40% 감소하여 다시마 푸코이단 추출물의 효과를 확인할 수 있었다. 역시 GPT level에 있어서도 CCl₄를 투여한 대조군이 정상군에 대해 약 11.5배정도 증가하여 간 장애 유발이 확인되었고 LFC군이 대조군에 비해 64%로 감소하는 것으로 나타나 다시마 푸코이단 추출물의 효소 level 감소 효과를 확인할 수 있었다. 간 조직에서의 SOD 활성정도는 대조군에서 정상군에 비해서 약 1.79배 정도로 낮게 나타났고 LFC군은 대조군에 비해 114%의 상승효과를 보였다. 또한 CAT의 활성도는 대조군에서 정

상군에 비해 약 1.59배 감소를 보였으며 LFC군은 대조군보다 36.1% 높게 나타났다. GPx 활성도의 경우 대조군은 정상군에 비해 약 2.5배의 감소율을 보였으며 LFC군은 대조군에 비해서 55.9%의 증가율을 보였다.

이러한 결과는 다시마 푸코이단 추출물이 간독성에서 효소 조절 효능을 가지므로 기능성 식품소재로 활용될 수 있음을 보여 주었다.

참 고 문 헌

1. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, *Methods. Enzymology* **105**, 121-126.
2. Ashburn, L. L., K. M. Endicott, F. S. Daft and R. D. Little. 1947. The nonportal distribution of trabecule in dietary cirrhosis of mouse and huinea pigs. *Am. J. Path.* **23**, 159
3. Ayako, Y., Y. Koichi and O. Keiichi. 1992. Iodine distribution in blades of several *Laminarias* grown in the same sea area. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **58**, 1373-1379
4. Beauchamp, C and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
5. Butler, T. C. 1990. Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissues and tissues constituents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **134**, 311-319.
6. Choi, J. H., J. S. Choi, D. S. Byun and D. S. Yang. 1986. Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity. II. Comparison of the inhibitory effect of algae and crude drug components on obesity. *Bull. Korean Fish. Soc.* **19**, 485-492
7. Jeong, C. S., K. W. Jung and J. S. Jeong. 1999. Hepatoprotective Effect of Subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on the Reversal of Biotransformation Enzyme Activities in CCl₄-induced Hepatotoxic Rats. *J. Ed. Hyg. Safety* **14(2)**, 172-178.
8. Fred, J., J. Yost and I. Fridovich. 1976. Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 514-518.
9. Fridovich, I. 1986. Biologic effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophysm* **247**, 1-15.
10. Gabriel, L. P and R. William, Hewitt. 1982. Hayes : Principles and Methods of Toxicology. *Raben Press*, pp. 407-445.
11. Gillette, J. R. 1977. Formation of reactive metabolites of foreign compounds and their covalent binding to cellular constituents. *American Physiological Society.*
12. Gutteridge, J. M. C., A. P. C. Beard and G. J. Quinlan. 1983. Superoxide-dependent lipid peroxidation. Problem with the use of catalase as a specific probe for Fenton-derived hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 901-907.
13. Ling, H. R., H. Sirén, M. L. Riekkola, P. Vuorela, H. Vuorela and R. Hiltunen. 1996. Optimized separation of

- pharmacologically active flavonoids from *Epimedium* species by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **746**, 123-129.
14. Hwang, S. H., J. I. Kim and C. J. Sung. 1996. Analysis of insoluble(IDF) and soluble dietary fiber (SDF) content of common Korean foods consumed by Korean male college students. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 278-285
 15. Kim, Y. Y., K. W. Lee, G. B. Kim and Y. K. Cho. 2000. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition. *J. Korean Fish. Soc.* **33**, 388-392
 16. Lahaye, M. 1991. Marine algae as sources of fibers contents in some sea vegetable. *J. Sci. Food Agric.* **54**, 587-594
 17. Lawrence, R. A and R. F. Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958.
 18. Lee, K. S., J. S. Seo and Y. S. Choi. 1998. Effect of sea tangle and hypoglycemic agent on lipid metabolism in diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 960-967
 19. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. S. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-261.
 20. McCay, P. B., E. K. Lai, J. L. Poyer, C. M. Dubose and E. G. Janzen. 1984. Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol. Chem.* **259**, 2135-2143.
 21. McPhalen, C. A., M. G. Vincent and J. N. Jansonius. 1992. X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **225**, 495-517.
 22. Nakashme, H., Y. Kido, N. Kobayashi, N. Motoki, M. Neushal and N. Yamamoto. 1987. Purification and characterization of an avian Myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea tangle. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1524-1530
 23. Oh, C. K., M. C. Oh, S. H. Kim, S. B. Rhim and S. H. Kim. 1998. Antimutagenic and antimicrobial effect of ethanol extracts from sea-mustard and sea tangle. *J. Korean Fish. Soc.* **31**, 90-94
 24. Rosen, D. R., M. Jakobisiak, R. Hartmann-Petersen, S. Ortega, D. J. Johnston. 1993. Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
 25. Ryu, B. H., D. S. Kim, K. K. Cho and D. B. Shin. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**, 595-600
 26. Tainer, J. A., E. D. Getzoff, J. S. Richardson and D. C. Richardson. 1983. Structure and mechanism of Cu, Zn, superoxide dismutase. *Nature* **306**, 274-287.
 27. Takaharu, N and Kiyonori, Y. 1999. Low-dose γ -ray irradiation reduces oxidative damage induced by CCl_4 in mouse liver. *Free Radical Biology Medicine* **27(11/12)**, 1324-1333.
 28. Tako, M., M. Uehara, Y. Kawashima, I. Chinen and F. Hongo. 1996. Isolation and identification of fucoidan from Okinawamozuku. Oyo Toshitsu Kagaku. *J. Appl. Glycosci.* **43**, 143-148
 29. Von, Sonntag. 1987. In "The Chemical Basis of Radiation of biology" Tylor and Francis.(ed.). London. pp. 31.
 30. Yosjikawa, T., M. Murakami, N. Yoshida, O. Seto and M. Kondo. 1983. Effects of superoxide dimutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas* **50**, 869-872.
 31. 조명행, 2004 : 기초 독성학 P 116-120.