

적채 분획물의 항산화 및 Tyrosinase 억제 효과

윤경아 · 박윤자 · 배송자[†]

신라대학교 식품영양학과 및 마린-바이오 산업화 지원센터

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of *Brassica oleracea* L. Fractions

Kyoung-A Yun, Yun-Ja Park and Song-Ja Bae[†]

Dept. of Food and Nutrition, and

Marine Biotechnology Center for Biofunctional Material Industries, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

This research was designed to investigate the antioxidant activity of red cabbage (*Brassica oleracea* L., BO) fractions on the liposomes consisted of L- α -dilinoleoylphosphatidylcholine (DLPC-liposome) and the tyrosinase activity of BO fractions. The methanol extract of BO (BOM) was fractionated into five different partition layers: hexane (BOMH), ethylether (BOME), ethylacetate (BOMEA), butanol (BOMB) and aqueous (BOMA) layers. The antioxidant activities of BOM fractions toward oxidized DLPC-liposome were examined by spectrophotometry measuring oxidized conjugated dines. The antioxidant activities of BOME and BOMEA fractions toward oxidized DLPC-liposomes were similar to the antioxidant activities of α -tocopherol and weaker than that of BHT. The synergy effects of antioxidation of BOME and BOMEA fractions added with vitamin C and α -tocopherol had even stronger antioxidant activities than the fractions without vitamin C and α -tocopherol. These results showed that the fractions of BOME and BOMEA could be developed as a potent antioxidant. Out of five different partition layers of BOM fractions, BOMEA exhibited the strongest tyrosinase activity of 94% at a concentration of 40 μ g/mL. This result suggests BOMEA fractions inhibit the formation of melanin and therefore can be used as the inhibitor of melanin synthesis. Results of antioxidant activity and tyrosinase inhibition indicate that useful bioactive substances exist in BOME and BOMEA fractions. Both fractions from BO (red cabbage) have the potential of being developed into health related products.

Key words: *Brassica oleracea* L., L- α -dilinoleoylphosphatidylcholine (DLPC), antioxidant, tyrosinase

서 론

자유라디칼은 노화와 질병의 원인 중의 하나이다. 자유라디칼은 적어도 한 쌍의 짝을 짓지 않은 전자들을 포함하는 것을 말하며, 원자 및 분자는 기본적으로 어떤 물질과 전자를 공유하여 안정화되려고 하며, 생체 내에 수많은 자유라디칼 등 활성산소종을 생성하게 한다(1-3). 이들 활성산소종은 각종 성인병과 노화, 특히 피부노화의 원인으로 큰 관심의 대상이 되고 있으며, 피부 면역 기능을 억제시켜 피부 염증을 유발시키고, 탄력감소, 주름살 및 기미·주근깨 등의 피부노화를 가속화시킨다(4-6). 따라서 자유라디칼을 제거할 수 있는 항산화제의 투여가 필요하며, 자외선 및 활성산소에 의한 결합조직 손상을 예방하고, 피부세포를 보호하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 활성산소종의 과잉 생성을 억제하고, 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템이 필요하다. 피부노화 방지에 있어서 천연물의

역할은 매우 중요한데, 이러한 천연 성분들은 항산화 방어 시스템 구축에 있어서 자외선 차단제, 항산화제 및 chelating agent로서의 역할을 할 수 있으며, 항산화제로는 vitamin E, vitamin C, carotenoid, ubiquinone/quinol, flavonoid 등이 주류 개선제로서, 결합조직 손상의 예방 및 치료에 사용될 수 있다(4). 따라서 자외선 노출에 의해 생성된 과잉의 활성산소를 감소시키는 것은 피부 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 것이다.

붉은 양배추라고 불리우는 적채(*Brassica oleracea* L.)는 flavonoid류에 속하는 색소성분인 anthocyanin을 많이 함유하고 있으며 특히, 노화의 원인인 free radical에 의한 세포손상을 막아줌으로써 심장질환과 암을 예방한다. 또한 노화억제, 항균, 콜레스테롤 저하작용 등 다양한 생리활성 작용을 하고, 기관지염 천식 등 호흡기 질환에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 이 색소는 항산화 활성면에서 천연 항산화제인 α -tocopherol보다 5~7배의 강한 효능을 나타

[†]Corresponding author. E-mail: sjbae@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5462, Fax: 82-51-999-5687

낸다고 알려져 있다(7).

양배추에 관한 연구로는 Ahn 등(8)이 양배추 은무늬 나방의 유약호르몬 엽육세포를 이용한 융합실험을 보고하였으며, Jin 등(9)은 당근 및 양배추 부산물 급여가 산유량 및 유지율에 미치는 영향을 보고하였다. Chi와 Lee(10)는 양액의 이온농도 차이가 케일 생장에 미치는 영향에 관하여 보고하였고, Jin과 Kim(11)은 무, 양파의 시료제조 방법에 따른 흰쥐의 지방대사와 항산화능에 관하여 보고하였으며, Lee 등(12)은 *Salmonella* 실험계에서 십자화과 채소류의 항돌연변이 효과를 보고하였다. 본 연구에서는 적채를 시료로 사용하여 노화의 원인으로 알려져 있는 유리 활성 산소의 생성을 억제시키는 항산화 효과를 연구하였고, 이 효과를 바탕으로 천연식품이 가지는 멜라닌 색소 생성저지 효과를 검토하였다.

적채의 항산화 효과 연구 중 인지질 리포솜에 적용시킨 연구는 아직 없으므로 기존 항산화효과 측정방법과의 안전성 및 타당성 검토와 함께 본 연구를 시행하게 되었다. 적채를 추출, 분획하여 각 용매별 시료를 얻고, 불포화 인지질인 L- α -dilinoleoylphosphatidylcholine(DLPC)로 구성된 DLPC-리포솜을 이용하여 적채의 항산화 효과를 알아보았으며, 기존 항산화력 측정법인 TBA가를 측정하면서 DLPC-리포솜 이용 항산화 효과를 비교, 검토하였으며 적채의 주성분으로서 항암효과가 있다고 알려진 순수품인 benzylisothiocyanate와 indole-3-carbinol(13)의 항산화 효과도 함께 비교하였으며, 멜라닌 형성을 방해하여 항노화 작용을 유도하는 유효물질의 존재 가능성을 알아보기 위해 tyrosinase이용 활성억제 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용된 적채는 2002년 5월 부산 엄궁 농산물 시장에서 구입하였다. 인지질 막 제조에는 불포화 인지질인 DLPC를 사용하였고, 항산화제인 α -tocopherol, butylated hydroxy toluene(BHT), vitamin C 및 melanin 색소 억제효과를 위해서 사용된 tyrosinase, kojic acid와 함께 Sigma사(St. Louis, Mo, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, benzylisothiocyanate, indole-3-carbinol, benzoyl peroxide는 polysciences Inc.(Washington, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 연구에 사용된 용매 및 시약은 특급으로 사용하였다.

시료의 추출 및 분획

시료로 사용된 적채는 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐 잘게 썬 후 음지에서 건조시켜 -70°C 에 보관하였다. 건조 시료 250 g에 methanol을 첨가한 후 3시간 동안 2회 반복 추출하였고, 회전식 진공 농축기로 감압 농축하여 methanol을 제거한 후 동결 건조한 methanol 추출물(BOM)을 실험에 사용하였다. Methanol 추출물(BOM)을 다시 hexane(BOMH), ethyl-

ether(BOME), ethylacetate(BOMEA), n-butanol(BOMB) 및 수층(BOMA)의 용매별로 순차 분획하고(Fig. 1), 각 분획층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

인지질-리포솜을 이용한 항산화 측정

불포화 인지질 DLPC를 일정량 취한 후 methanol/chloroform(1:1) 혼합 용매를 사용하여 DLPC 불포화 인지질을 용해시킨 후 인지질 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 적채 용매별 추출물(BOM fraction, 각 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 각각 가하고, 필요시 α -tocopherol(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 BHT(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 동량 가한 후 N_2 gas하에서 시험관을 돌려가며 용매를 제거하고 얇은 인지질막 film을 만들었다. 이 얇은 인지질막 film을 진공 오븐에 넣어 상전이 온도(50°C) 상에서 약 1시간 동안 잔류 용매를 날려 보냈다. 이렇게 만든 인지질 건조피막에 일정량의 인산 완충용액(pH 7.4)을 가한 후 DLPC 상전이 온도 이상에서 30초간 방치하고 30초간 3회 강하게 교반하는 것을 반복 실시하여 다중층 리포솜(multilamellar vesicles)을 제조하였다. DLPC-리포솜에 산화제인 benzoyl peroxide를 인위적으로 가하여 과산화물(peroxide)을 생성시킨 후, 산화시키기 전 지질의 고유 흡광도(202 nm)와 산화시킨 후 생성된 과산화물의 산화 정도를 흡광도(234 nm)로서 측정하였으며, 이 흡광도비(234 nm/202 nm)를 산화지수(oxidation index)로 하여 비교 검토하였다(14). 산화 전후의 DLPC-리포솜의 산화지수는 4시간 동안 방치하면서 매 시간마다 경시변화를 관찰하였으며, 각각 4회 측정 후 그 평균값을 취하였다.

Thiobarbituric acid value(TBA가)를 이용한 항산화 측정

일정량의 대두유에 ethanol로 용해시킨 적채 분획물을 0.1% 농도가 되도록 각각 첨가하였으며, 항산화력 대조군인 α -tocopherol도 같은 방법으로 취하였다. 즉 대두유에 대조군과 시료를 각각 0.1% 농도로 첨가한 후 60°C , 100°C , 145°C 에서 각각 처리하여 유지 3 g을 취하고 benzene 10 mL를 가하여 분액 깔대기에 정량적으로 옮겨 놓고, TBA 시약(thiobarbituric acid 0.67 g을 물에 가하여 수조에서 가열 용해한 후 전량을 100 mL로 하고 여기에 glacial acetic acid 200 mL를 가함)을 10 mL 가하여 4분간 혼돈 후, 정지한 액을 두 층으로 분리시킨다. 수층을 시험관에 취하고 끓는 수조에서 30분간 가열한 후 냉각시켜 532 nm TBA가를 측정함으로써 대두유에 대한 적채 분획물의 항산화 효과를 비교 검토하였다.

Tyrosinase 활성 측정

Melanin 형성 효소인 tyrosinase에 작용해 멜라닌 색소의 생성을 억제하고, 피부에서 활성산소종 생성을 억제하는 효과를 검증하기 위하여 적채 분획물의 tyrosinase에 대한 활성을 측정하였다. Tyrosinase 활성도는 96 well을 사용하여 측정하였으며, 대조군에는 tyrosinase 용액 170 μL 를 취하고,

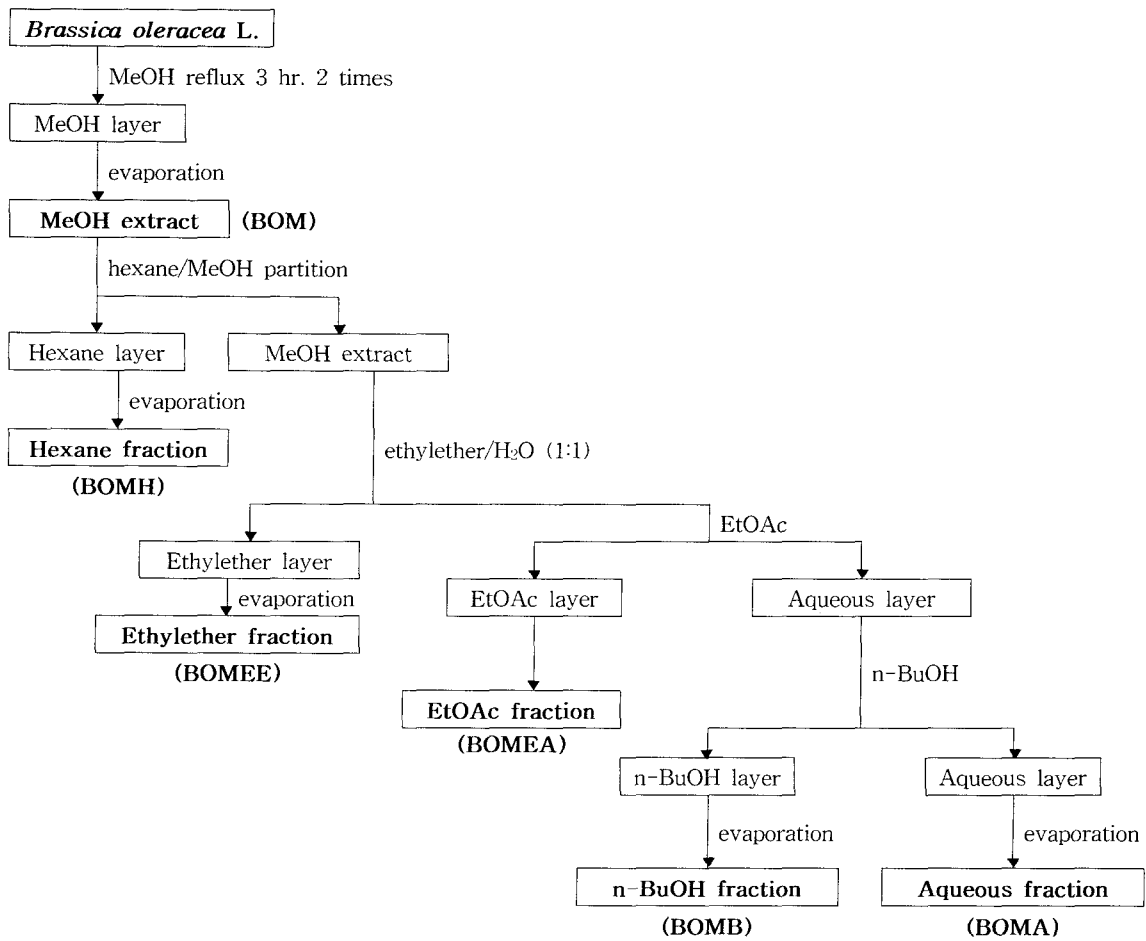


Fig. 1. Procedure of various solvent fractions from *Brassica oleracea* L. var.

시료군에는 적채의 분획물과 kojic acid를 10, 20, 30 및 40 µg/mL씩 각각 취한 후, 대조군과 시료군에 모두 각각 tyrosinase를 20 µL씩 다시 추가 첨가하여 최종용액의 양이 190 µL가 되도록 하고, 30분간 반응시킨 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 비교 분석하였다.

통계처리

시료는 각각 4회 측정하여 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군의 통계적 유의성에 대한 검증은 student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

인지질 리포솜을 이용한 항산화 효과

산화 전후의 DLPC-리포솜 고유의 흡광도에 대한 산화지수는 산화 전의 지질 고유 흡수대인 202 nm에서의 흡광도를 기준으로 하여 conjugated diene, hydroperoxide 및 peroxid 등 산화 후 생성된 과산화지질의 흡수대인 234 nm에서의 흡광도의 비를 이용하여 나타내었다.

Table 1은 불포화 인지질 DLPC에 적채의 각 분획물 2

µg/mL를 가하여 만들어진 DLPC-리포솜에 미치는 적채 분획물의 항산화 정도를 경시변화로 비교한 결과이다. 즉, 불포화 인지질인 DLPC에 적채의 용매별 분획물 2 µg/mL를 각각 가하여, 다중층 인지질막의 리포솜을 만들고, 산화제인 benzoyl peroxide를 가하여 인위적으로 산화시켰다. 시료 분획별 항산화 효과를 비교하기 위하여 일반적으로 널리 알려진 항산화제인 BHT와 α-tocopherol을 대조군으로 하여 DLPC-리포솜에 각각 2 µg/mL씩 시료 대신 포집하고 그 항산화 정도를 비교 검토해 보았으며, 1시간 간격으로 4시간까지 관찰한 후 각 시간별 흡광도 수치를 얻고, 그 산화정도를 산화 전(202 nm)과 산화 후(234 nm)의 산화지수로서 나타내었다.

즉, 1시간에서 4시간까지의 경시 변화를 본 결과 시료를 가하지 않고 인위적으로 산화만 시킨 DLPC-리포솜의 산화지수에 비해 적채의 5가지 용매 분획물을 각각 2 µg/mL씩 첨가하였을 때의 산화지수가 대체적으로 모두 낮았으며, 특히 ethylether 분획층인 BOME와 ethylacetate 분획층인 BOMEA를 첨가하였을 때의 산화지수가 전반적으로 낮아 이 두 층의 높은 항산화 효과를 볼수 있었다. 다음으로 butanol 분획층인 BOMB, hexane 분획층인 BOMH 및 수층인 BOMA

Table 1. Oxidation index of DLPC-liposome and DLPC-liposomes incorporated with BOM fractions, α -tocopherol and BHT

Encapsulants ¹⁾	Oxidation index (234 nm/202 nm)			
	1	2	3	4 (hr)
Control (=DLPC ²⁾)	0.578 ± 0.021 ⁴⁾	0.596 ± 0.021	0.623 ± 0.019	0.652 ± 0.020
BOME E	0.408 ± 0.023	0.446 ± 0.020	0.472 ± 0.023	0.506 ± 0.023
BOME A	0.439 ± 0.021	0.443 ± 0.021	0.493 ± 0.026	0.542 ± 0.022
BOMB	0.452 ± 0.020	0.505 ± 0.021	0.510 ± 0.021	0.531 ± 0.024
BOMA	0.501 ± 0.030	0.526 ± 0.025	0.542 ± 0.020	0.559 ± 0.021
BOMH	0.464 ± 0.024	0.509 ± 0.031	0.536 ± 0.025	0.546 ± 0.020
α -toco ³⁾	0.442 ± 0.021	0.489 ± 0.028	0.506 ± 0.021	0.536 ± 0.031
BHT	0.395 ± 0.023	0.427 ± 0.027	0.461 ± 0.023	0.492 ± 0.025

¹⁾DLPC: L- α -dilinoleoylphosphatidylcholine, BOME E: ethylether fraction of *Brassica oleracea* L. var, BOME A: ethylacetate fraction of *Brassica oleracea* L. var, BOMB: butanol fraction of *Brassica oleracea* L. var, BOMA: aqueous fraction of *Brassica oleracea* L. var, BOMH: hexane fraction of *Brassica oleracea* L. var.

²⁾DLPC L: DLPC-liposome.

³⁾ α -toco: α -tocopherol.

⁴⁾Values are mean ± SD.

순으로 각 항산화 효과가 나타났다. 전반적으로 산화가 진행되는 초기 1시간 동안의 산화지수가 가장 낮았으며, 대체적으로 시간이 지날수록 조금씩 산화가 진행되어 산화지수가 증가되는 경향이였다. 이 결과를 다시 정리해보면, 적체 분획물 시료를 가하지 않은 DLPC-리포솜만의 산화지수는 1시간 경과시 0.578이었으나, BOME E를 2 μ g/mL 가한 경우의 산화지수는 0.408, BOME A를 가한 경우는 0.439였고, 일반적으로 널리 알려진 항산화제인 BHT와 α -tocopherol을 첨가한 경우 그 산화지수는 각각 0.395 및 0.442로서 적체의 분획물 중 BOME E의 경우 BHT를 가한 DLPC-리포솜의 항산화 효과와 비슷하였고, BOME A를 가한 경우에는 α -tocopherol을 가했을 때의 산화지수와 거의 비슷하여 적체 분획물의 높은 항산화 경향을 알 수 있었다. 이 경향은 4시간 경과시까지 거의 같은 정도로 지속되었다.

적체의 항산화 상승효과를 살펴보기 위하여 각 용매별 분획물에 아메방, 면역기능 등 다양한 생리작용을 가지는 vitamin C와 항산화제로 알려져 있는 α -tocopherol을 각각 2 μ g/mL씩 첨가하여 합성한 DLPC-리포솜에 가한 결과는 Table 2 및 3과 같다. Table 2는 적체의 각 용매별 분획층에 vitamin C를 2 μ g/mL씩 첨가한 후의 항산화 상승효과를 나

타낸 결과이다. 이 결과에서 보면 vitamin C를 단독 가한 경우 높은 산화지수를 나타내었으며, 이 현상은 *in vitro*계에서 vitamin C가 일정농도 이상에서는 지질의 과산화 및 phenol의 수산화 등의 산화 반응을 항진시키고 산화 촉진제로서 작용한다는 Kirkland 등(15)의 보고로서도 설명되어진다. 그러나 BOME E 및 BOME A를 비롯한 적체의 모든 분획층에 vitamin C를 2 μ g/mL씩 첨가시, 첨가하지 않은 경우보다 전반적으로 항산화 상승효과가 뚜렷이 나타남을 알 수 있었다. 1시간 경과시의 산화지수를 살펴보면 BOME E에 vitamin C를 첨가한 경우 0.372로서 BHT에 vitamin C를 첨가한 경우의 0.379와 산화지수가 거의 비슷하였고, 시간이 경과함에 따라 전반적으로 산화지수가 높아졌으며, 그 경향은 서로 비슷하였다. 즉, 4시간 경과 후 BOME E에 vitamin C를 첨가한 경우의 산화지수는 0.456이었으며 BHT에 vitamin C를 첨가한 경우 0.436이었다. Table 2의 결과는 vitamin C를 첨가함으로써 적체 분획물만을 첨가한 결과인 Table 1에서보다 산화지수가 월등히 낮아졌으며, 전반적으로 vitamin C 첨가로 인한 항산화 상승효과를 인지할 수 있었다. 특히, Table 1에서 BOMH의 경우 vitamin C를 첨가하지 않았을 때에는 1시간 경과 후의 산화지수가 0.464이었으나, vitamin C를 2 μ g/mL

Table 2. Synergy effects of antioxidant activity on DLPC-liposomes with vitamin C incorporated with various BOM fractions, α -tocopherol and BHT

Encapsulants ¹⁾	Oxidation index (234 nm/202 nm)			
	1	2	3	4 (hr)
Vit. C ²⁾	0.668 ± 0.009 ³⁾	0.688 ± 0.008	0.696 ± 0.012	0.720 ± 0.012
BOME E + Vit. C	0.372 ± 0.007	0.397 ± 0.013	0.411 ± 0.010	0.456 ± 0.006
BOME A + Vit. C	0.396 ± 0.007	0.442 ± 0.006	0.452 ± 0.009	0.492 ± 0.009
BOMB + Vit. C	0.413 ± 0.007	0.472 ± 0.005	0.501 ± 0.007	0.529 ± 0.008
BOMA + Vit. C	0.497 ± 0.008	0.501 ± 0.007	0.537 ± 0.008	0.553 ± 0.007
BOMH + Vit. C	0.432 ± 0.008	0.493 ± 0.006	0.515 ± 0.006	0.537 ± 0.007
α -toco + Vit. C	0.421 ± 0.007	0.462 ± 0.007	0.483 ± 0.007	0.522 ± 0.006
BHT + Vit. C	0.379 ± 0.010	0.395 ± 0.007	0.400 ± 0.010	0.436 ± 0.009

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Vit. C: Vitamin C.

³⁾Values are mean ± SD.

첨가시에는 1시간 후 산화지수는 0.432로 낮아졌다. 또 BOMB와 BOMA에 vitamin C를 첨가했을 경우에서도 Table 1에서의 vitamin C 무첨가의 경우보다 항산화 상승효과가 뚜렷이 나타났다.

Table 3은 적체의 각 용매별 분획층에 α -tocopherol을 첨가한 DLPC-리포솜의 항산화 효과를 조사한 결과이다. α -tocopherol을 첨가했을 때 vitamin C 첨가의 경우와 같이 적체의 모든 층에서 항산화 상승효과가 나타났다. 즉, Table 3에서 보듯이 BOME에 α -tocopherol을 첨가했을 때 첨가하지 않았을 때의 산화지수 0.408에 비하여(Table 1) 첨가시 0.372로 낮아져 뚜렷한 항산화 상승효과가 나타났으며, BOMEA에서도 α -tocopherol 처리시 1시간 경과 시의 산화지수를 살펴보면, α -tocopherol을 첨가시에는 0.381로 나타났으며, 이 결과는 BHT만을 포함한 DLPC liposome의 경우 0.395와 비슷한 수치를 나타내었다. 또한, 적체 분획물 중 단독으로는 항산화 효과가 비교적 약했던 BOMH, BOMB 및 BOMA의 경우 α -tocopherol을 첨가했을 때 항산화 상승효과가 뚜렷이 나타났다. 특히, 항산화성이 낮았던 BOMB에 α -tocopherol을 첨가했을 때 높은 항산화 상승효과가 나타났다. 즉, 1시간 경과 후 BOMB의 산화지수는 0.452로 나타났으나, α -tocopherol을 첨가했을 때는 0.420으로 낮은 산화지수를 보여 항산화 상승효과를 알 수 있었고, BOMA의 경우에도 α -tocopherol을 첨가했을 때 0.482로 첨가하지 않은 경우 0.501에 비해 항산화 상승효과가 뚜렷이 나타났다. 전반

적으로 α -tocopherol을 첨가했을 때의 항산화 상승효과는 vitamin C를 동일량 첨가했을 때와 비슷한 경향이였다.

본 실험 결과, 적체의 각 분획층 중 BOME와 BOMEA에서 항산화 효과가 뚜렷하였으며, vitamin C와 α -tocopherol을 첨가했을 때에도 가장 높은 항산화 상승효과가 나타났고 특히, 그 효과가 약했던 BOMH, BOMB 및 BOMA에서는 각 분획층에 vitamin C와 α -tocopherol을 각각 첨가했을 때에는 항산화 상승효과가 뚜렷이 나타났다.

한편 식품 속의 항암 등 생리활성 물질이 있는 것으로 알려져 있는 적체의 특수 성분인 benzylisothiocyanate와 indole-3-carbinol의 일정량을 사용하여 DLPC-리포솜에 가함으로써 적체의 천연 분획물과의 항산화 효과를 측정, 비교 검토한 결과는 Table 4와 같다. 즉, DLPC-리포솜 내부에 benzylisothiocyanate와 indole-3-carbinol을 각각 2 μ g/mL씩 같은 방법으로 산화시킨 후 각 산화지수를 측정한 결과, benzylisothiocyanate를 가한 DLPC-리포솜의 산화지수보다 BOME를 첨가한 경우의 산화지수가 더 낮아 이 분획물의 항산화 효과가 컸고, BOMEA의 산화지수는 0.439로서 benzylisothiocyanate 0.433 및 indole-3-carbinol 0.447의 결과와 비슷하였으며, DLPC-리포솜에 α -tocopherol을 가한 경우의 산화지수 0.452보다는 조금 낮았다. 적체의 ethylether 분획물인 BOME의 산화지수가 가장 낮게 나타나 잘 알려진 항산화제인 BHT를 가한 경우와 비슷한 효과를 나타내었고, 이 산화지수는 DLPC-리포솜에 적체의 특수 순수성분인 ben-

Table 3. Synergy effects of antioxidant activity of DLPC-liposomes with α -tocopherol incorporated with various BOM fractions, α -tocopherol and BHT

Encapsulants ¹⁾	Oxidation index (234 nm/202 nm)			
	1	2	3	4 (hr)
α -toco	0.442 \pm 0.007 ²⁾	0.489 \pm 0.007	0.506 \pm 0.010	0.536 \pm 0.012
BOME + α -toco	0.372 \pm 0.010	0.411 \pm 0.006	0.452 \pm 0.008	0.495 \pm 0.010
BOMEA + α -toco	0.381 \pm 0.008	0.432 \pm 0.009	0.472 \pm 0.014	0.532 \pm 0.010
BOMB + α -toco	0.420 \pm 0.009	0.444 \pm 0.007	0.497 \pm 0.007	0.521 \pm 0.010
BOMA + α -toco	0.482 \pm 0.009	0.511 \pm 0.007	0.538 \pm 0.010	0.549 \pm 0.009
BOMH + α -toco	0.412 \pm 0.012	0.478 \pm 0.011	0.511 \pm 0.012	0.526 \pm 0.007
α -toco + α -toco	0.393 \pm 0.008	0.452 \pm 0.009	0.491 \pm 0.010	0.521 \pm 0.010
BHT + α -toco	0.357 \pm 0.007	0.339 \pm 0.010	0.426 \pm 0.011	0.454 \pm 0.016

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are mean \pm SD.

Table 4. Oxidation index of DLPC-liposome and DLPC-liposomes incorporated with benzylisothiocyanate, indole-3-carbinol, α -tocopherol and BHT

Encapsulants ¹⁾	Oxidation index (234 nm/202 nm)			
	1	2	3	4(hr)
Control (=DLPC)	0.531 \pm 0.008 ²⁾	0.588 \pm 0.007	0.634 \pm 0.011	0.690 \pm 0.010
Benzylisothiocyanate	0.433 \pm 0.006	0.461 \pm 0.011	0.499 \pm 0.009	0.526 \pm 0.006
Indole-3-carbinol	0.447 \pm 0.008	0.513 \pm 0.008	0.544 \pm 0.010	0.568 \pm 0.007
BOME	0.408 \pm 0.009	0.446 \pm 0.010	0.472 \pm 0.011	0.506 \pm 0.012
BOMEA	0.439 \pm 0.006	0.443 \pm 0.012	0.493 \pm 0.007	0.542 \pm 0.009
α -toco	0.452 \pm 0.010	0.497 \pm 0.009	0.523 \pm 0.008	0.554 \pm 0.007
BHT	0.402 \pm 0.011	0.436 \pm 0.008	0.462 \pm 0.007	0.498 \pm 0.012

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are mean \pm SD.

zyliosthiocyanate와 indole-3-carbinol을 가한 산화지수보다 더 낮았다. DLPC-리포솜에 BOMEE를 가한 경우의 산화지수는 BHT의 항산화 정도와 비슷하였고, benzylisothiocyanate를 가한 경우는 적체의 ethylacetate 분획층인 BOMEA를 가한 경우와 비슷하였으며, indole-3-carbinol의 경우는 α -tocopherol을 첨가한 경우와 비슷하였고, 적체 순수 특수 성분은 benzylisothiocyanate가 indole-3-carbinol보다 항산화 효과가 비교적 큰 편이었다. 실제로 BOMEE와 BOMEA층에 적체의 생리활성 성분인 benzylisothiocyanate와 indole-3-carbinol이 얼마나 존재하는지는 추후 연구검토가 필요하다.

TBA가를 이용한 항산화 효과

대두유에 적체의 각 분획물을 각각 0.1%가 되도록 첨가하여 60°C, 100°C와 145°C의 조건에서 각각 산화시켰으며, 전반적으로 60°C에서는 대두유에 TBA가의 변화는 거의 없었으며, 100°C와 145°C의 조건에서의 각 TBA가를 측정된 결과는 Fig. 2와 3에 나타내었다.

Fig. 2는 100°C에서 처리했을 때의 24시간, 48시간 및 72시간에 따른 경시적인 TBA가를 나타낸 결과로서, 대두유에 α -tocopherol을 첨가한 경우 24시간 경과시부터 무첨가 대조군인 대두유에 비해 TBA가가 다소 낮았으며, 적체 분획물 중 BOMEE와 BOMEA를 가한 경우 시간경과 후부터 대조군과 α -tocopherol군보다 낮은 TBA가를 나타내어 24시간 경과시키는 거의 절반 수준으로 높은 산화 억제효과를 보여주었다. 24시간 이후의 TBA가는 BOMEE와 BOMEA에서 각각 2.18과 2.42로 α -tocopherol을 가했을 때의 3.85에 비해 아주 낮은 TBA가를 나타내어 적체 분획물의 높은 항산화성을 나타내었으며, 72시간 후에도 각각 3.13과 3.47을 나타내어 α -tocopherol을 가한 TBA가가 4.55일 경우와 비교시 괄목할 만한 높은 항산화 효과를 보여주었다.

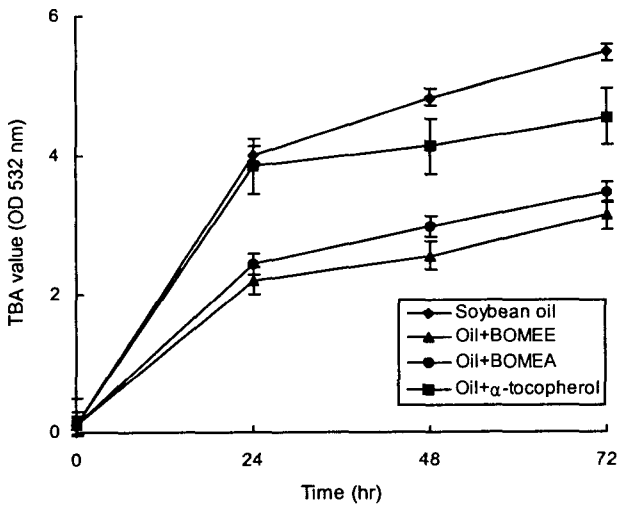


Fig. 2. Changes of TBA value during heat treatment of soybean oil at 100°C.

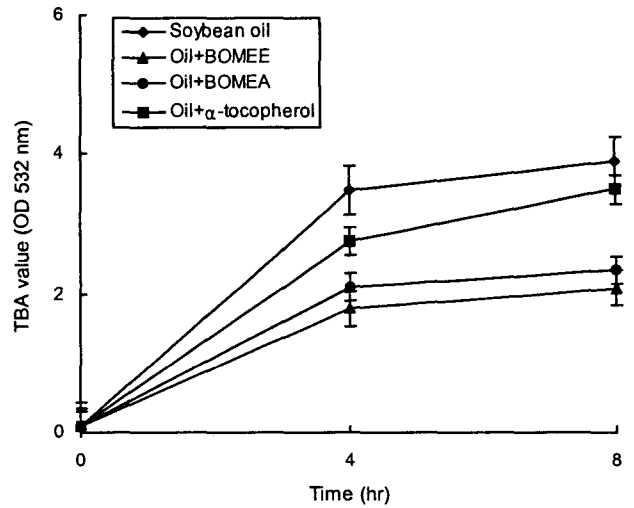


Fig. 3. Changes of TBA value during heat treatment of soybean oil at 145°C.

Fig. 3은 보다 높은 조건인 145°C에서의 4시간 및 8시간 경과 후의 TBA가를 측정된 결과로, 100°C에서와 같이 BOMEE에서 가장 낮은 TBA가를 나타내어 기존 항산화제인 α -tocopherol에 비해 높은 항산화성을 보여주었고, BOMEA에도 같은 경향으로 낮은 TBA가를 나타내었다.

이와 같은 결과는 일반적인 항산화 효과 측정방법인 TBA가에서도 적체의 BOMEE와 BOMEA층에서 강력한 항산화 효과를 나타내어 DLPC-리포솜을 이용한 항산화 효과 측정 결과와 그 경향이 매우 유사하였으므로 불포화 인지질을 산화시켜 항산화 효과를 측정하는 방법으로 DLPC-리포솜을 이용한 항산화 효과 측정법의 안정성 및 타당성에 그 의의를 둘 수 있다고 하겠다.

Tyrosinase 활성 억제 효과

피부는 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 멜라닌이 합성되어 피부노화가 촉진되며(16-18), 이때 생성된 자유라디칼은 지질, 단백질, 당 및 핵산을 손상시키고 세포막의 파괴에 관여함으로써 돌연변이 유발, 피부암을 포함한 발암, 성인병 및 노화 등을 촉진시키는 원인 요소로 알려져 있다. 이런 피부 색소 침착과 피부 흑화 현상의 원인인 멜라닌은 미용적인 측면에서의 색소 침착뿐만 아니라 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포 사멸 촉진 등의 부정적인 기능을 하고 있다(19,20). 이제까지 밝혀진 기전은 Fig. 4와 같으며, 이 색소는 멜라닌 세포의 melanosome에서 합성되어 아미노산과 L-tyrosine이 3,4-dihydroxyphe-nylalanine(L-dopa)으로 전환됨으로써 이 기전이 시작된다(21). 이 기전에서 L-dopa는 효소인 tyrosinase에 의해 dopa-quinone으로 산화되며, 이 dopa-quinone은 상대적으로 불안정한 중간 매체인 dopa-chrome으로 전환된 후 5,6-dihydroxy indole을 거쳐 멜라닌 고분자를 형성한다. 그러므로 자외선 및 활성산소에 의한 결합조직 손상을 예방하고, 피부 세포를 보호하기 위해서는 활성 산소를 효율적으로 제거할

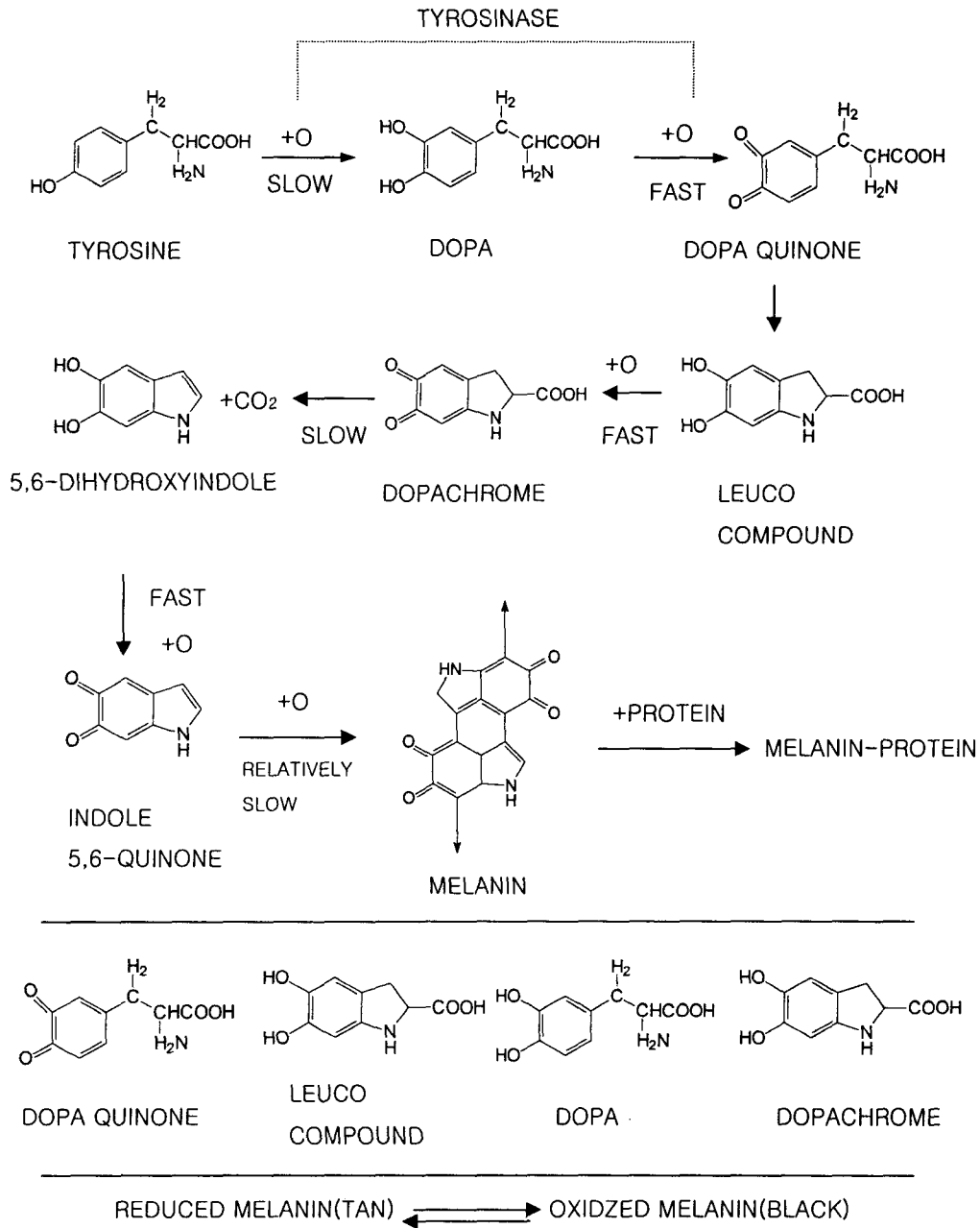


Fig. 4. Formation of melanin via phenolase action on tyrosine.

수 있는 항산화 방어 시스템 구축이 필요하다.

본 연구에서는 적채 분획물 성분이 멜라닌 합성 억제에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase의 활성 억제 효과를 *in vitro* 방법으로 측정해 보았다. Table 5는 멜라닌 색소를 억제하며 미백 작용을 지닌 미백제인 kojic acid(22)를 표준 물질로 하여 10, 20, 30 및 40 µg/mL씩 각각 첨가한 후의 tyrosinase 활성도를 적채의 각 분획물의 tyrosinase 활성 억제 효과와 비교 측정할 결과이며, 적채 분획물의 첨가량이 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 농도 의존적으로 증가하였다. Fig. 5는 Table 5의 결과 중 tyrosinase 활성 억제 효과가 좋은 BOMEA와 표준물질인 kojic acid의 경우를 도

Table 5. Inhibitory effects of various BOM fractions and kojic acid on tyrosinase activity (inhibition rate %)

Fractions ¹⁾	Concentration (µg/mL)			
	10	20	30	40
BOMH	0.00 ± 0.06 ²⁾	-3.40 ± 0.15	-16.6 ± 0.09	-20.5 ± 0.07
BOME	12.7 ± 0.08	28.9 ± 0.07	33.5 ± 0.07	54.3 ± 0.08
BOMEA	34.2 ± 0.09	62.7 ± 0.09	83.9 ± 0.05	94.0 ± 0.07
BOMB	7.20 ± 0.07	9.30 ± 0.06	10.7 ± 0.07	17.2 ± 0.09
BOMA	0.00 ± 0.08	-0.20 ± 0.12	-0.40 ± 0.15	3.60 ± 0.06
Kojic acid	55.9 ± 0.07	85.4 ± 0.09	92.8 ± 0.10	99.9 ± 0.09

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are mean ± SD.

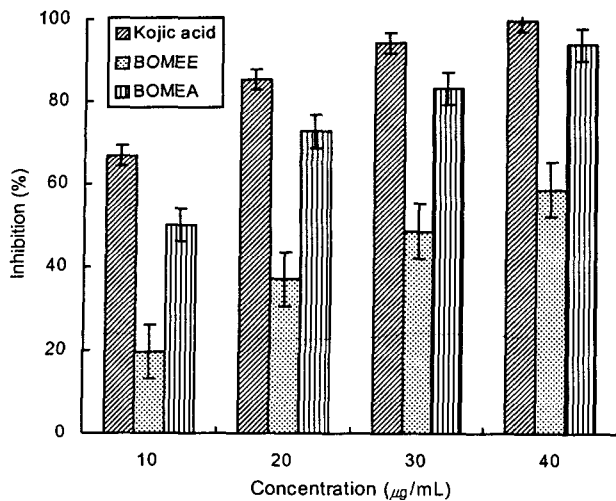


Fig. 5. Inhibitory effects of BOMEe, BOMEA and kojic acid on tyrosinase activity.

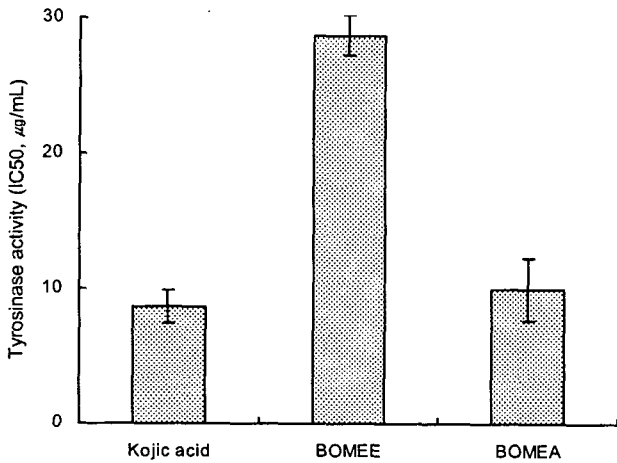


Fig. 6. Inhibitory effects of BOMEe, BOMEA fractions and kojic acid at IC₅₀ tyrosinase activity.

표로 나타낸 그림이며, BOMEe의 효과도 함께 나타내어 보았다. 즉 최종 농도인 40 µg/mL의 kojic acid를 첨가시 99.9%의 tyrosinase 활성 억제 효과가 나타났으며, BOMEA를 첨가한 경우 94.0%의 높은 tyrosinase 활성 억제 효과가 나타났다. BOMEe의 경우에는 54.3%의 약한 멜라닌 색소 형성 억제 효과를 나타내었다. 다른 분획물인 BOMB, BOMA 및 BOMH의 경우는 그 정도가 아주 미약하였다. Fig. 6은 tyrosinase 활성도의 IC₅₀을 측정된 도표로서, BOMEA의 경우에는 10.0 µg/mL 첨가했을 경우 대조군인 kojic acid의 8.7 µg/mL와 유사한 tyrosinase 활성 저해효과를 나타내었다. 이 결과에 의해 적체의 BOMEA층에는 다른 용매 분획물의 경우보다 tyrosinase 활성 억제 효과가 아주 높은 물질이 존재함을 시사하고 있다.

요 약

본 연구에서는 식품으로 애용되고 있는 적체가 가진 항산

화 효과와 멜라닌 합성을 저해하는 tyrosinase 활성 억제 효과를 항노화 과정의 기초 자료로서 알아보기 위해 본 연구를 수행하였다. 즉, 인지질 리포솜 내부에 적체의 용매별 분획물을 가하고 그 산화 지수를 구하여 각 항산화 효과를 측정하였으며, 적체의 ethylether 분획층인 BOMEe와 ethylacetate 분획층인 BOMEA의 결과 이미 항산화제로 널리 알려져 있는 BHT와 α -tocopherol을 대조군으로 가하여 비교해 보았으며 이들에 비해 높은 항산화 효과를 나타내었다. 또 본 연구에서는 이미 알려진 항산화제인 vitamin C와 α -tocopherol을 DLPC-리포솜에 가했을 때의 항산화 상승효과도 함께 살펴보았다. 즉, DLPC-리포솜에 BOMEe와 BOMEA 일정량을 가했을 때 이미 높은 항산화 상승효과가 나타났으며, vitamin C와 α -tocopherol을 첨가시 더욱 높은 항산화 상승효과가 나타났다. 적체 분획물 단독으로 가했을 때에는 항산화 효과가 없었던 BOMH, BOMB 및 BOMA에서도 상승효과가 나타났다. DLPC-리포솜을 이용한 적체 분획물의 항산화 효과를 이미 공인되어 사용되고 있는 TBA를 측정하여 비교 검토하였다. 발색정도를 비색 정량하여 유지의 산패도를 측정하는 TBA를 이용한 실험 결과 DLPC-리포솜을 이용한 항산화 결과와 거의 비슷하였으며, 이 경우 BOMEe와 BOMEA에서 높은 항산화 효과를 나타냄으로서 불포화 인지질로 구성된 DLPC-리포솜에 시료를 첨가하여 항산화 효과를 측정본 실험의 결과가 TBA의 결과를 통해 다시 한번 그 효과를 확인할 수 있었다. 이와 더불어 진행되는 활성산소의 증가로 인한 노화의 한 과정을 적체 중의 멜라닌 색소 형성방지 효과의 면에서 연구 검토하였으며, 요즈음은 멜라닌의 합성을 억제하는 물질들에 대한 연구가 천연물을 대상으로 많이 이루어지고 있으므로 본 연구에서는 시험관 내 실험에서 적체 분획물 BOMH, BOMEe, BOMEA, BOMB 및 BOMA를 일정량 취하고, kojic acid를 10, 20, 30 및 40 µg/mL의 농도로 각각 처리하여 tyrosinase 활성을 측정된 결과 특히 BOMEA층에서 농도 의존적으로 tyrosinase 활성억제가 컸음을 관찰하였다. 이상 노화를 예방하는 항산화 및 멜라닌 색소 형성억제 물질을 연구 결과, 적체의 분획물 중 BOMEe와 BOMEA층에서 가장 두드러진 항산화효과를 나타내었고, tyrosinase 활성 억제 효과는 BOMEA층이 우세하였다. 이 결과에 의해 현재 식품 식품으로서만 사용되는 적체의 생리활성 성분 중 비극성 부분에서 노화를 억제시킬 수 있는 항산화제 및 피부의 흑화를 방지할 수 있는 미백제 원료로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Kim JD, Kim JH. 1999. Development of anti-oxidant tea for anti-aging. *Bull Uosu Nat'l Univ* 14: 401-409.
2. 太田靜行. 1987. 食品と酸化防止劑. 食品資料研究會. p 1-38.
3. Cho BI. 1993. Toxicity of oxygen free radical and clinical use of scavengers. *The Kon-kuk J of Medical Sciences* 3: 115-130.

4. Park SN. 1999. Skin aging and reaction oxygen species. *J Seoul National Univ of Technology* 50: 329-341.
5. Kligman LH, Akin FJ, Kligman AM. 1993. Sunscreens promote the repair of ultraviolet radiation-induced dermal damage. *J Invest Dermatol* 81: 98-102.
6. Plastow SR, Lovell CR, Young AR. 1987. UVB-induced collagen changes in the skin of the hairless albinomouse. *J Invest Dermatol* 88: 145-148.
7. Bissett DL, Chatter JR, Hannon DP. 1991. Chronic ultraviolet radiation-induced increases in skin iron and the photopotentive effect of topically applied iron chelators. *Photochem Photobiol* 54: 215-223.
8. Ahn KH, On SW, Lee KR. 1999. Tissue specific juvenile hormone epoxide hydrolase during the last stadium of the cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. *J Basic Science* 24: 71-79.
9. Jin SH, Choung CC, Kim MC. 1987. Effect of feeding whole carrots and cabbages and their residues on milk yield and fat content. *Cheju National University Journal* 25: 37-43.
10. Chi SH, Lee KH. 1997. Effect of 4 different ionic strengths of nutrient solution on growth in hydroponically grown kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) plants. *J Korean Institute of Technology* 4: 229-235.
11. Jin AS, Kim MK. 2001. Effect of dry powders, ethanol extracts and juices of radish and onion on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *The Korean Nutrition Society* 34: 513-524.
12. Lee SI, Sim JM, Rhee SH, Park KY. 1997. Antimutagenic effect of various cruciferous vegetables in *Salmonella* assay-ing system. *J Fd Hyg Safety* 12: 321-327.
13. Wattenberg LW. 1991. Inhibition of carcinogenic mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 39: 1897-1901.
14. Gregory G. 1984. *Liposome technology*. CRC Press, New York. p 139.
15. Kirkland DJ, Galloway SM, Sofuni T. 1994. Summary of major conclusions. *Mutat Res* 312: 205-211.
16. Chen JS, Wei SC, Marshall MR. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 39: 1897-1901.
17. Yang MJ, Kim MG, Ann HS, Ahn RM. 1999. Inhibitory effects of water-aceton extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji* 43: 494-501.
18. Chun HJ, Choi EY, Uoon SC, Nam HW, Beak SH, Woo WH. 2001. Inhibitory effects of ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma* alba on melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji* 45: 269-275.
19. Kawfman RJ. 1991. Vectors used for expression in mammalian cells. *Math In Enzymol* 87: 205-209.
20. Kaneyama K, Takemura T, Jamada Y, Sakai C, Kondon S, Nishiyama S. 1993. Rignent production in murine melanoma cells in regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermal* 100: 126-135.
21. Ando H, Horikawa T, Oka M. 1991. Linoleic acid can induce depigmentation in cultured normal human melanocytes during activity proliferating sate. *J Dermatol Sci* 2: 248-256.
22. Romero GC. 1997. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiate keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 99: 635-641.

(2003년 8월 9일 접수; 2004년 1월 5일 채택)