

클로로필의 광산화에 미치는 β -카로틴과 비타민 C의 영향

류승희¹ · 이혜숙¹ · 이영순² · 권태완¹ · 송영선¹ · 문갑순^{1*}

¹인제대학교 식품과학연구소, 바이오헬스소재 연구센터 및 인제대학교 식품생명과학부
²경희대학교 식품영양학과

Effect of β -Carotene and Vitamin C on Chlorophyll-Induced Photooxidation

Seung-Hee Ryu¹, Hye-Suk Lee¹, Young-Soon Lee², Tai-Wan Kwon¹,
Young-Sun Song¹ and Gap-Soon Moon^{1*}

¹Food Science Institute, Biohealth Products Research Center, and School of Food and Life Science,
Inje University, Gimhae 621-749, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract

Skin is continuously exposed to ultraviolet (UV) radiation, the major cause of skin disorders including skin aging. Chlorophylls were well known as photosensitizer initiating subsequent chemical reactions such as photooxidative deterioration of cellular structures. This experiment was designed to elucidate the effects of β -carotene and ascorbic acid with chlorophylls on UVB-induced photooxidation in linoleic acid emulsion model system and skin homogenate of ICR mouse. In linoleic acid emulsion model system, the addition of chlorophyll and β -carotene accelerated the photooxidation, while high concentration of ascorbic acid prevented. The combination of chlorophylls, β -carotene and ascorbic acid, which concentrations are simplified from mustard leaf *kimchi*, prevented UVB-induced photooxidation. Although single treatment of β -carotene accelerated photooxidation, β -carotene acted as antioxidant in the combination with ascorbic acid. Similarly the addition of individual chlorophylls and β -carotene accelerated the UVB-induced photooxidation in skin homogenate of ICR mouse. 50 ppm of ascorbic acid did not show the any preventive effect, however 500 ppm of ascorbic acid effectively prevented the oxidation. Photooxidation was prevented in the combination of chlorophylls and β -carotene with 500 ppm of ascorbic acid and concentration rate of ascorbic acid plays an important role in the prevention of UVB-induced photooxidation.

Key words: ultraviolet B, photooxidation, chlorophylls, β -carotene, ascorbic acid

서 론

대기 중의 오존층 고갈로 인해 자외선에 대한 노출이 빈번해짐에 따라 이로 인한 질환들이 증가하고 있다(1). 태양광선에 대한 신체의 반응은 매우 복잡하나 공기 중의 산소와 더불어 자외선에 의하여 생성되는 활성산소가 다양한 광생물학적 반응을 매개하는 것으로 보고되고 있다(2). 특히 지질산화에 의한 세포막의 손상이 피부 노화의 중요한 인자라고 보고되고 있으며 따라서 항산화제의 섭취는 지질의 산화를 억제하여 피부노화를 막을 수 있는 방안으로 제시되고 있다.

김치는 여러 가지 재료를 사용하여 담그므로 β -카로틴과 비타민 C 뿐만 아니라 페놀화합물과 같은 항산화성분이 풍부한 식품이다(3). Ryu 등(4)은 hairless mouse에 배추김치, 갓김치, 부추김치를 섭취시킨 후 자외선 B 조사유무가 간과

피부조직의 지질 산화에 미치는 영향을 조사한 실험에서 흥미로운 결과를 얻었다. 자외선 B를 조사하지 않았을 때에는 간과 피부조직 모두에서 김치섭취군의 지질과산화물의 생성은 대조군에 비해 억제되었고 특히 갓김치와 부추김치는 유의적으로 지질의 산화로부터 신체를 방어하였다. 자외선 B 조사시 대조군의 경우 지질과산화는 증가하였고 배추김치와 갓김치 섭취는 대조군에 비해 지질과산화물의 생성을 억제하였으나 유독 부추김치 섭취군에서만 지질산화가 촉진되는 현상을 볼 수 있었다. 즉 암반응에서는 부추김치 섭취군에서 가장 큰 항산화효과가 나타난 반면 광선 조사시 부추김치 섭취군에서 지질 및 단백질 조직의 산화가 다른 김치군에 비해 증가하였고 이는 각각의 김치류에 함유되어 있는 클로로필, β -카로틴과 비타민 C의 함량에서의 차이에 기인하는 것으로 보인다.

특히 자외선에 의해 일어나는 광산화(photooxidation)는

*Corresponding author. E-mail: fdsnmoon@inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3234, Fax: 82-55-321-0691

자외선 조사 후 증가되어지는 산화된 유리기의 생성에 의해 일어나고, 클로로필, hematoporphyrin, 플라빈과 같은 색소들은 효과적인 감광체(photosensitizer)로 알려져 있으며 이들이 가시광선 주위의 자외선광을 흡수하여 광산화를 가속화 시킨다(5,6). β -카로텐은 유리라디칼의 생성을 억제할 수 있으며(7), 수용성 항산화제인 비타민 C 역시 광산화로 부터 식품을 보호할 수 있다(8). 부추김치는 클로로필 함량이 가장 높은 반면 β -카로텐과 비타민 C의 함량은 갖김치에 비해 낮았고 이러한 항산화성분의 함량 및 구성비에 따라 광산화정도의 차이가 나타난 것으로 보이지만 그 기작은 명확하지 않다. 따라서 본 연구에서는 클로로필의 광산화에 미치는 β -카로텐과 비타민 C의 역할을 linoleic acid emulsion 모델 시스템과 피부조직 균질액을 이용하여 조사하고 이와 더불어 각각의 성분들의 조합시 일어나는 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

시약

실험에 사용되어진 클로로필 a와 b, β -카로텐 및 비타민 C, thiobarbituric acid(TBA), 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)은 Sigma에서 구입하였으며 linoleic acid는 Fluka (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 그 외 시약들은 특급으로 사용하였다.

Linoleic acid emulsion의 제조

자외선 B 조사시 클로로필 a, 클로로필 b, β -카로텐 및 비타민 C의 효과를 조사하기 위해 실험 모델계로 linoleic acid emulsion을 제조하였다. 에탄올에 용해시킨 10% linoleic acid 3 mL, 0.05 M 인산 완충액(pH 7.0) 6 mL, 증류수 3 mL와 농도를 달리한 시료를 첨가한 후 emulsion액이 총 15 mL이 되도록 인산 완충액으로 조정된 뒤 30, 60, 120, 180분간 자외선 B를 조사하였다.

ICR mouse 피부 균질액의 제조

체중 약 25 g 내외인 정상 ICR mouse(실험동물센터, 대전)의 털을 전기 삭발기로 깎은 다음 표피와 진피를 포함하는 피부조직을 떼어내어 찬 생리식염수로 잘 씻어서 털과 혈액 등을 제거한 후 Kim과 Lee(9)의 방법에 따라 피부 균질액을 만들었다. 즉 일정량의 피부조직을 잘게 자른 다음 10배 부피의 0.25 M sucrose용액에 담근 상태에서 iris scissors로 세절하여 거의 젤 상태가 되도록 하였다. 이 피부조직을 다시 glass homogenizer로 마쇄하여 균질액으로 만든 다음 원심분리(800×g, 20분)한 뒤 그 상층액에 클로로필 a, b 및 β -카로텐, 비타민 C를 단독 또는 혼합하여 첨가하였다. 이 용액을 petri dish에 균등하게 담고 온도 상승을 방지하기 위해 얼음주머니를 이용하여 냉각시키면서 자외선 B를 1시간 간격으로 3시간까지 조사하였다.

자외선 B 조사

광산화의 유도를 위해 자외선 B light(규격 FSX24T12, 광원 280~320 nm)가 장착된 자외선 조사기(National biological corporation, Ohio, USA)를 이용하여 자외선 B를 조사하였다. 농도를 달리한 시료가 혼합되어진 linoleic acid emulsion 및 피부균질액을 petri dish에 담고 20 cm의 높이에서 시간을 달리하여 자외선 B에 노출시켰다. 이때 조사량은 $18.3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (UV radiometer, UM-10, Minolta Co., Japan)였다.

Thiobarbituric acid method(TBA법)

지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)의 함량은 TBA법을 이용하여 측정하였다. Linoleic acid emulsion의 경우 Buege와 Aust(10)의 방법에 따라 0.5 mL의 시료에 20% trichloroacetic acid 0.5 mL와 0.67% TBA 0.25 mL를 혼합한 후 98~100°C에서 10분간 가열하였다. 반응액을 완전히 식힌 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

피부균질액에서 MDA 함량은 Ohkawa 등(11)의 방법에 따라 시료 0.2 mL와 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 mL, 50% NaOH로 pH 3.5로 보정한 20% acetic acid 1.5 mL, 0.8% TBA 1.5 mL 및 증류수 0.8 mL를 넣어 95~98°C에서 60분간 반응시켰다. 찬물에서 완전히 식힌 후 증류수 1 mL와 n-butanol:pyridine(15:1, v/v) 5 mL을 넣고 vortex하여 4,000 rpm에서 원심분리한 후 분리된 유기용매층을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)를 사용하였다.

Ferric thiocyanate method(FTC법)

Ferric thiocyanate법에 의한 과산화정도의 측정은 Mitsuda 등(12)의 방법에 따라 linoleic acid emulsion 0.1 mL, 75% 에탄올 4.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL, 3.5% HCl에 용해시킨 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL을 혼합한 후 정확히 3분 뒤 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고, SPSS program을 이용하여 One-way ANOVA로 처리한 뒤 $\alpha=0.05$ 의 수준에서 유의차가 나타날 경우 Tukey test로 각 군간의 유의성을 사후검정하였다.

결과 및 고찰

Linoleic acid emulsion에 첨가된 클로로필, β -카로텐 및 비타민 C가 광산화에 미치는 영향

클로로필, β -카로텐 및 비타민 C가 자외선 B에 의해 유도되는 광산화에 어떠한 영향을 미치는지를 linoleic acid emulsion 모델 시스템으로 조사하였다. 이때 지질과산화의 측정

을 위해 2가지 측정방법, 즉 thiobarbituric acid(TBA)법과 ferric thiocyanate(FTC)법을 사용하였다. 산화과정중 과산화물은 저분자화합물로 점차 분해되며 이러한 화합물 중 하나인 malondialdehyde의 함량을 측정하는 것이 TBA법이다(13). FTC법은 지질산화 초기 단계동안의 과산화물 함량을 측정하기 위해 사용되어지는 방법으로 지질과산화물에 의해 ferrous가 ferric ion으로 산화되고 산화된 ferric ion이 thiocyanate와 복합체를 형성하면 이를 500 nm에서 간편하게 측정할 수 있다(14).

Linoleic acid emulsion에 농도를 달리한 시료들을 첨가한 뒤 자외선 조사 시간을 달리하였을 때 생성된 malondialdehyde(MDA)함량을 TBA법으로 정량한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 모든 실험군에서 자외선 B 조사시간에 비례하여 MDA 생성량이 증가하였고 클로로필 a와 b의 첨가는 대조군에 비해 지질과산화를 가속화시키는 것으로 나타났으나 농도에 의존적이지는 않았다. β -카로틴의 경우 고농도(50 ppm)에서 지질과산화가 뚜렷하게 증가되었으며 저농도에서는 자외선 B 조사 2시간까지는 대조군에 비해 MDA 생성이 억제되었던 것으로 나타났다. 반면 비타민 C의 경우 50 ppm에서 지질과산화가 효과적으로 억제되었으며 10 ppm과 1 ppm의 농도에서도 자외선 B 조사 1시간까지는 대조군보다 MDA 생성이 적어 광산화를 억제하는 효과가 있었다.

동일한 linoleic acid emulsion 모델 시스템에서 FTC법에 의한 지질과산화억제효과를 측정할 결과 자외선 B조사 시간에 비례하여 linoleic acid의 산화가 증가됨을 알 수 있었다

(Fig. 2). 또한 클로로필 a와 b는 자외선 B에 의한 광산화를 가속화시키는데 관여하였고 이때 농도의존적으로 지질의 산화를 촉진시키는 것으로 나타났다. 특히 50 ppm의 클로로필 a와 b의 첨가는 대조군에 비해 2배 이상 산화를 가속화시켰으며 클로로필 a와 b는 유사한 정도의 산화촉진활성을 나타내는 것으로 보였다. 고농도(50 ppm)의 β -카로틴 첨가 시 대조군에 비해 과산화정도는 증가하였으며 10 ppm과 1 ppm 첨가 시 대조군과 유사하였다. 이와는 달리 비타민 C의 첨가는 농도 의존적으로 자외선 B에 의한 광산화를 억제하였고 50 ppm 농도에서는 다른 시료들에 비해 가장 우수한 항산화활성을 나타내었다.

채소류의 주색소인 클로로필은 식물에 널리 분포되어 있는 천연 녹색 색소로서 식물 세포내의 엽록체에 존재하여 채소나 과일의 신선함을 나타내는 지표가 되기도 한다. 또한 상처의 치료효과, 세균 생육의 저지효과, 조절작용, 간기능의 증진 작용, 탈취작용 등의 생리활성을 나타내어 건강보조 식품으로도 널리 이용되고 있다(15). 클로로필은 광선이 차단된 상태에서는 free radical scavenger로 작용하여 지방질의 자동산화 등을 방지할 뿐만 아니라 항 돌연변이성 및 항암성이 있다는 보고가 있다(16,17). 그러나 클로로필 및 그 유도체들은 빛의 존재시에는 감광체로 작용하여 triplet oxygen(3O_2)으로부터 singlet oxygen(1O_2)를 생성한다(18). Singlet oxygen은 불포화지방산의 이중결합에 위치한 탄소와 반응하여 과산화물을 생성시키며 이 과산화물은 분해되어 유리기에 의한 지질의 광산화를 촉진시킨다. 특히 클로로필

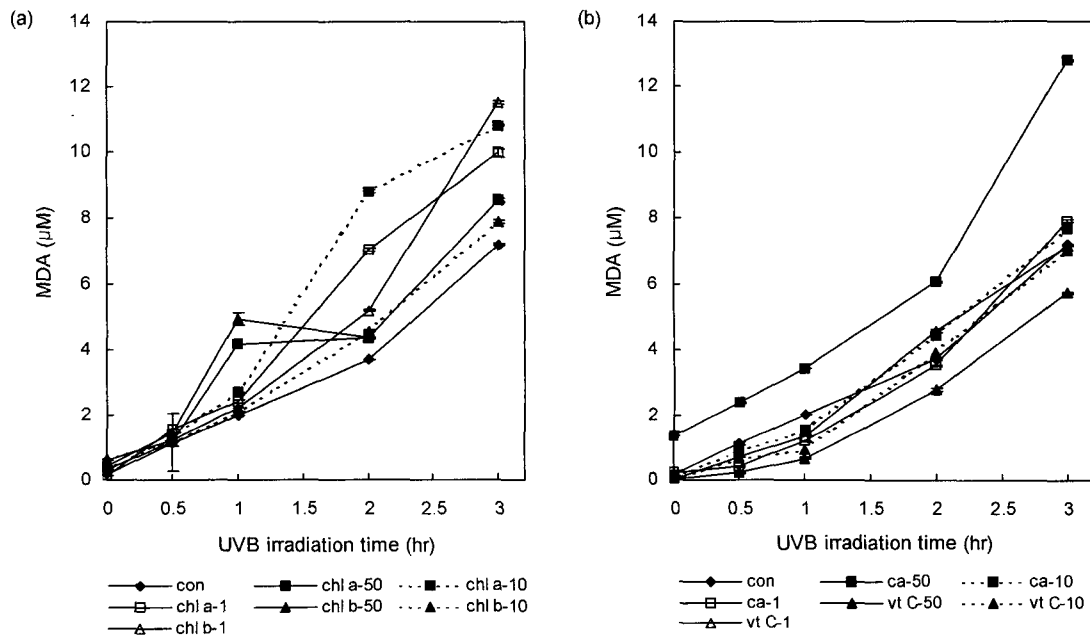


Fig. 1. Effect of chlorophylls, β -carotene, and ascorbic acid in the UVB radiated linoleic acid emulsion as measured by the TBA method. Values are mean \pm SD (n=3). In the caption, chl a, chl b, ca, and vt C mean chlorophyll a, chlorophyll b, β -carotene and ascorbic acid respectively. 50, 10, and 1 mean a final concentration (ppm) in the emulsion.

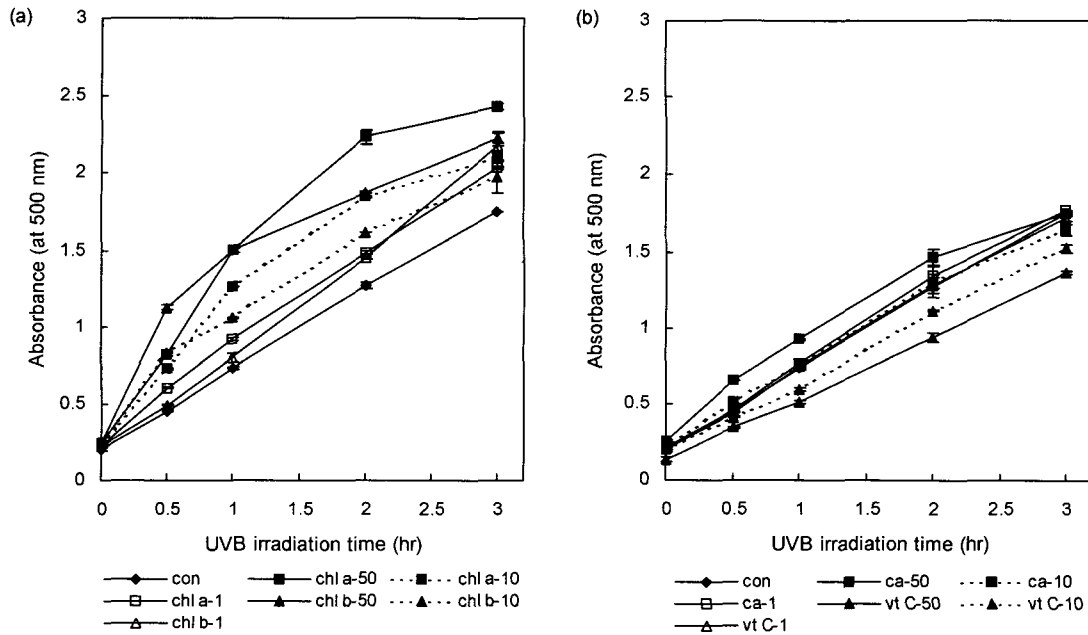


Fig. 2. Effect of chlorophylls, β -carotene, and ascorbic acid in the UVB radiated linoleic acid emulsion as measured by the FTC method.

Values are mean \pm SD (n=3).

In the caption, chl a, chl b, ca, and vt C mean chlorophyll a, chlorophyll b, β -carotene and ascorbic acid respectively. 50, 10 and 1 mean a final concentration (ppm) in the emulsion.

은 pH의 저하시 pheophorbide가 생성되며 생체내에서 광증감제로써 산화를 촉진하여 독성을 나타낸다(19). 본 연구에서도 클로로필은 linoleic acid emulsion 모델 시스템에서 자외선 B에 의한 지질산화를 촉진시켰으며 농도가 높을수록 산화가 가속화되는 경향을 나타내어 다른 연구들의 결과와 일치하였다.

이러한 광산화를 억제하기 위해 항산화제가 사용될 수 있으나 모든 항산화제가 광산화를 억제하는 효과를 나타내는 것은 아니다. 잘 알려진 라디칼 소거제인 BHA나 BHT는 singlet oxygen을 소거하는 능력이 떨어져 기름의 광산화에 대한 항산화능력을 나타내지 않는다(20). 그러나 ascorbic acid, ascorbyl palmitate, carotenoids와 tocopherols과 같은 항산화제는 광산화를 억제하는 작용을 한다(18,21-22).

클로로필이 풍부한 식물체에는 carotenoids 및 비타민 C의 함량 역시 높다. Carotenoids는 생물체 특히 식물조직에 널리 퍼져 있는 지용성 황색 색소물질로 식품의 천연색소와 생체대사 등에 중요한 역할을 하는 비타민 A의 전구체이기도 하다. 특히 β -카로텐은 비타민 A 활성 이외에도 항산화제 기능, 색소로서의 기능을 가지며, 항암, 노화방지 등에 중요한 생리적 활성을 가지고 있다고 보고되고 있다(23). β -카로텐은 활성산소종으로부터 막지질, 단백질 그리고 DNA를 보호하며 NO_2 -유래 DNA 단일사슬 절단과 nitric oxide-유래 돌연변이에 대한 보호작용을 하기도 한다(24). 그러나 β -카로텐의 항산화제로서의 기능에 대한 논란도 계속되고 있다. 일부 연구에서 β -카로텐의 섭취가 흡연자에 있어서는 오히

려 폐암의 발생을 증가시킬 수 있으며 이는 nitrogen oxides나 산소함량이 높은 흡연자의 폐에서 β -카로텐이 다르게 작용하는 것으로 생각되어진다(25). Anderson과 Anderson(26)은 과도한 β -카로텐의 섭취(100 IU/kg diet)는 methyl mercuric chloride에 노출된 CBA mouse의 간, 신장, 뇌에서 지질과산화물을 증가시킨다고 보고하였고, Lomnitsky 등(27)도 500 mg β -카로텐/kg diet의 식이섭취는 쥐의 고환에서 MDA값을 증가시켰다고 보고한 바 있다. β -카로텐의 pro-oxidant 효과는 두 가지 기작으로 설명되어질 수 있는데 과도한 β -카로텐 peroxy radical의 생성과 β -카로텐 autooxidation의 가속화 때문이다(28). 본 연구에서도 β -카로텐은 고농도에서 지질의 광산화를 촉진하는 것으로 나타났다.

β -카로텐과 함께 식물체에 다량 존재하고 있는 수용성 항산화제인 비타민 C는 효과적인 항산화제이다. Ascorbate와 산화된 형태인 ascorbyl radical 모두 reduction potential이 낮고 따라서 생체내의 다른 라디칼이나 산화제와 쉽게 반응할 수 있다(29). Ascorbate가 α -tocopherol radical로부터 α -tocopherol를 재생시킨다는 것은 잘 알려져 있으며(30), β -카로텐의 radical cation을 소거하는데 중요한 역할을 한다(31). Linoleic acid emulsion을 이용한 본 실험에서도 단독으로 사용되어진 비타민 C는 MDA의 생성과 지질과산화물의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

Linoleic acid emulsion 시스템에서 클로로필, β -카로텐 및 비타민 C의 조합이 광산화에 미치는 영향

Linoleic acid emulsion 시스템에서 클로로필은 잘 알려진

바와 같이 자외선에 의한 광산화를 촉진하였고 항산화 효과가 있을 것으로 기대되었던 β-카로텐 역시 농도가 높을 경우 광산화를 촉진하는 것으로 나타났다. 실험에 사용한 시료 중 비타민 C만이 자외선에 의해 유도되는 광산화를 억제시키는 것으로 나타났다. 시료들이 조합되어 사용되었을 경우 광산화에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해 클로로필 a와 b, β-카로텐의 농도를 각각 50 ppm, 25 ppm, 50 ppm으로 고정하고, 비타민 C의 농도는 10배 높은 500 ppm으로 고정시킨 후 이들의 조합시 생성되는 MDA 함량을 측정하였다(Table 1). 이 농도는 이전 실험(4)에서 효과가 가장 뛰어났던 갖김치 중에 함유되어 있는 클로로필 a와 b, β-카로텐 및 비타민 C의 농도비를 간소화시켜 나타낸 것이다. 클로로필 a와 b 그리고 β-카로텐을 조합하였을 때 β-카로텐 단독으로 사용하였을 경우보다 지질과산화는 억제되었고 대조군과는 유사한 정도의 과산화가 유발되었다. 그러나 클로로필과 비타민 C를 조합하여 사용하였을 때에는 대조군에 비해 지질과산화가 유의적으로 억제되었고(p<0.05), 비타민 C를 단독 사용한 것과 유사한 정도의 효과를 나타내었다. 즉 비타민 C는 클로로필에 의해 유도되는 지질과산화를 효과적으로 억제하는데 관여하였고 이 네 가지 시료를 조합하였을 때에도 대조군보다는 낮은 MDA값을 나타내었

다. 특히 β-카로텐의 경우 단독으로 사용되었을 때에는 지질과산화를 촉진시키지만 다른 항산화성분들과 함께 사용될 경우 항산화활성을 나타내는 것으로 보여진다.

위의 실험과 동일한 조건에서 FTC법에 의한 지질과산화 정도를 측정된 결과에서 클로로필 a와 b, β-카로텐은 지질과산화를 촉진한 반면 비타민 C는 자외선 조사 2시간까지 뚜렷한 항산화활성을 나타내었으나(p<0.05) 조사시간 3시간째에는 효과가 떨어진 것으로 나타났다(Table 2). 클로로필과 β-카로텐의 조합시 지질산화 억제효과는 나타나지 않았으며 클로로필과 비타민 C의 조합시 조사 1시간째까지는 강한 항산화활성이 나타났으나(p<0.05) 그 이후에는 효과가 없는 것으로 나타났다. 클로로필과 β-카로텐, 비타민 C를 조합하였을 경우 역시 조사 1시간째에 강한 지질산화 억제 활성이 나타났으나 그 이후에는 산화가 진행되는 것으로 나타났다.

Linoleic acid는 세포막 인지질의 주요 필수성분중의 하나로 자외선 조사, 화학물질 또는 다른 요인들에 의해 생성되는 활성산소종에 의한 산화적 스트레스에 노출되어 있다(32). 클로로필은 linoleic acid의 광산화를 유도하였고 항산화제로 알려져 있는 β-카로텐 역시 본 실험모델계에서는 자외선에 의한 지질과산화를 유도하는 것으로 나타났으며 단

Table 1. Effect of mixed antioxidants on the UVB radiated linoleic acid emulsion as measured by the TBA method (Unit: μM)

Compounds ¹⁾	UVB irradiation time (hr)			
	0	1	2	3
Control	0.013±0.010 ^{2)a3)}	1.441±0.198 ^b	3.467±0.087 ^b	9.805±0.883 ^{bc}
Chlorophyll a (Chl a)	0.343±0.114 ^{bc}	1.272±0.098 ^b	3.975±0.082 ^{bc}	10.604±0.044 ^{cd}
Chlorophyll b (Chl b)	0.238±0.063 ^{ab}	1.348±0.198 ^b	4.337±0.534 ^c	10.562±0.036 ^{cd}
β-Carotene (Car)	0.692±0.050 ^d	2.479±0.134 ^c	5.346±0.223 ^d	11.714±0.120 ^d
Ascorbic acid (Vt C)	0.217±0.162 ^{ab}	0.877±0.063 ^a	2.407±0.203 ^a	8.759±1.356 ^{ab}
Chl a+Chl b+Car	0.499±0.053 ^{cd}	1.495±0.058 ^b	3.551±0.069 ^b	9.141±0.044 ^{abc}
Chl a+Chl b+Vt C	0.142±0.026 ^{ab}	0.869±0.091 ^a	2.176±0.210 ^a	7.557±0.106 ^a
Chl a+Chl b+Car+Vt C	0.579±0.091 ^{cd}	1.365±0.074 ^b	2.575±0.158 ^a	8.296±0.656 ^{ab}

¹⁾Concentration of samples are chlorophyll a 50 ppm, chlorophyll b 25 ppm, β-carotene 50 ppm, or ascorbic acid 500 ppm, respectively.

²⁾Data are mean±SD (n=3).

³⁾Values with same letter (a~d) in the same column are not significantly different (p<0.05), between samples.

Table 2. Effect of mixed antioxidants on the UVB radiated linoleic acid emulsion as measured by the FTC method (Unit: Abs at 500 nm)

Compounds ¹⁾	UVB irradiation time (hr)			
	0	1	2	3
Control	0.268±0.008 ^{2)b3)}	0.815±0.012 ^c	1.175±0.018 ^b	1.562±0.023 ^a
Chlorophyll a (Chl a)	0.330±0.008 ^{bc}	1.160±0.042 ^c	1.693±0.069 ^f	2.294±0.019 ^c
Chlorophyll b (Chl b)	0.345±0.020 ^{bc}	1.001±0.019 ^d	1.500±0.035 ^c	1.952±0.013 ^b
β-Carotene (Car)	0.392±0.055 ^c	0.991±0.022 ^d	1.472±0.051 ^{de}	1.906±0.025 ^b
Ascorbic acid (Vt C)	0.106±0.023 ^a	0.361±0.043 ^a	0.662±0.083 ^a	2.487±0.048 ^c
Chl a+Chl b+Car	0.395±0.049 ^c	1.224±0.021 ^e	1.962±0.002 ^e	2.493±0.077 ^c
Chl a+Chl b+Vt C	0.086±0.008 ^a	0.529±0.095 ^b	1.287±0.058 ^{bc}	2.334±0.059 ^c
Chl a+Chl b+Car+Vt C	0.114±0.020 ^a	0.504±0.024 ^b	1.349±0.050 ^{cd}	2.419±0.187 ^c

¹⁾Concentration of samples are chlorophyll a 50 ppm, chlorophyll b 25 ppm, β-carotene 50 ppm, or ascorbic acid 500 ppm, respectively.

²⁾Data are mean±SD (n=3).

³⁾Values with same letter (a~g) in the same column are not significantly different (p<0.05), between samples.

지 비타민 C만이 보호효과를 나타내었다. 그러나 생체에서는 이러한 성분들이 단독으로 존재하는 것이 아니라 여러 농도로 조합되어 존재하고 있으며 따라서 클로로필과 β -카로틴 및 비타민 C가 함께 존재할 때 서로 보완적으로 작용하여 광산화를 억제하는 것으로 나타났다. 이때 광산화를 억제하기 위해 비타민 C의 농도는 클로로필이나 β -카로틴의 10 배량 정도에서 효과가 나타났고 동량이거나 2배일 경우 효과가 미미하였다(data는 나타내지 않았음).

피부 광산화에 미치는 클로로필, β -카로틴 및 비타민 C의 시너지 효과

ICR mouse의 표피와 진피를 포함하는 피부조직 균질액을 만든 후 여기에 클로로필, β -카로틴, 비타민 C를 단독 또는 조합하여 혼합한 뒤 자외선 조사에 따른 MDA 생성량을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Linoleic acid emulsion 모델 시스템을 이용하였을 때 지질과산화가 천천히 일어나는 것에 비해 피부조직 균질액을 이용하였을 때에는 2시간부터 급격하게 MDA 생성량이 증가하는 것으로 나타났고 이는 피부조직 중 존재하는 다양한 산화촉진물질들에 기인하는 것으로 보여진다. 앞의 실험결과와 마찬가지로 자외선 조사 1시간 후 클로로필 a와 b는 대조군에 비해 MDA 생성량이 증가한 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 β -카로틴의 첨가시 조사 1시간과 2시간에서 다른 시료들과 비교해 가장 높은 MDA값을 나타내어 피부조직에서도 광산화를 가속화시키는 것으로 나타났다. 비타민 C를 농도별로 첨가하였을 때 50 ppm에서는 효과가 나타나지 않았으며 500 ppm 첨가시 뚜렷한 MDA생성 억제효과를 나타내었고 이는 앞의 결과들과 동일하였다.

클로로필과 β -카로틴 조합시 자외선 조사 1시간 후 급격한 MDA 농도증가가 나타났으며 클로로필에 50 ppm의 비타민 C를 첨가하였을 때에도 지질과산화가 가속화되었다.

그러나 클로로필과 500 ppm의 비타민 C의 조합은 지질과산화를 효과적으로 억제하였고 자외선 조사 3시간까지 그 효과가 지속되는 것으로 나타났다. 클로로필과 β -카로틴, 50 ppm의 비타민 C 조합은 항산화효과가 나타나지 않았으며 비타민 C의 함량을 증가시켰을 때 자외선 조사 2시간과 3시간에서 대조군에 비해 뚜렷한 산화억제효과가 나타났다.

자외선은 자외선 A(320~400 nm), 자외선 B(280~320 nm)와 자외선 C(200~280 nm)로 나누어지며 이중 자외선 B의 조사는 광손상을 유도하고 피부노화를 이끄는 것으로 잘 알려져 있다. 활성산소종으로부터 세포를 보호하는 효소적 또는 비효소적 항산화제는 자외선 조사에 의해 영향을 받는다. 활성산소가 항산화방어를 넘어설 때 세포손상이 나타나며 따라서 항산화제의 섭취는 자외선에 의해 유도되는 종양의 개시나 전암증상 부위가 종양으로 발전되는 것로부터 세포를 보호한다(33). 피부에서는 자외선 조사 후 interstitial collagenase인 metalloproteinase 1(MMP-1)과 산화적 스트레스 marker 유전자인 heme oxygenase 1(HO-1) 같은 유전자의 변화가 유도되며 두 유전자 모두 singlet oxygen과 밀접하게 연관되어진다(34). 자외선에 의해 유도되는 MMP-1에 대한 보호는 저농도의 비타민 C, 비타민 E 또는 carnosic acid에 의해 얻어지는 반면 β -카로틴과 lycopene은 MMP-1의 발현을 증가시키고 β -카로틴의 이러한 효과는 비타민 E가 함께 존재할 때 완전하게 억제되어진다(35). 일반적인 스트레스 유전자인 HO-1은 β -카로틴 단독 처리시 증가되지만 β -카로틴, 비타민 C, 비타민 E의 조합은 이것을 억제시킨다(36). 즉 β -카로틴이 단독으로 사용될 때에는 피부에서의 광산화를 유발하는 작용을 하나 이것이 비타민 C와 함께 존재할 때에는 보호 작용을 나타내게 된다는 것을 의미한다. 하지만 β -카로틴의 소수성과 내부 막에서의 β -카로틴의 위치는 수용성인 비타민 C가 카로틴 라디칼을 효과적으로 소거하지 못하게 한다. 다른 가능성은 β -카로틴

Table 3. Effect of chlorophylls, β -carotene and ascorbic acid on UVB-induced photooxidation in the ICR mouse skin homogenate (unit: nmole MDA/mg protein)

Compounds ¹⁾	UVB irradiation time (hr)			
	0	1	2	3
Control	1.682±0.381 ^{2)ab3)}	1.389±0.952 ^a	14.014±1.003 ^d	14.035±0.880 ^b
Chlorophyll a (Chl a)	1.931±0.576 ^{ab}	2.326±1.514 ^a	12.862±2.231 ^{cd}	14.639±1.388 ^b
Chlorophyll b (Chl b)	3.635±1.734 ^b	2.623±0.366 ^a	14.246±0.525 ^d	13.079±0.854 ^b
β -Carotene (Car)	1.489±0.117 ^a	3.022±0.558 ^a	19.366±3.005 ^e	13.742±1.648 ^b
Ascorbic acid (Vt C-50)	0.917±0.156 ^a	2.263±0.528 ^a	15.195±2.432 ^{de}	14.075±1.929 ^b
Ascorbic acid (Vt C-500)	1.087±0.173 ^a	0.901±0.223 ^a	2.144±0.142 ^a	7.448±0.719 ^a
Chl a+Chl b+Car	2.286±0.201 ^{ab}	9.003±0.902 ^{bc}	12.180±0.813 ^{bcd}	14.952±1.215 ^b
Chl a+Chl b+Vt C-50	2.005±0.203 ^{ab}	10.219±0.617 ^{cd}	14.953±0.930 ^d	14.453±0.946 ^b
Chl a+Chl b+Vt C-500	1.672±0.156 ^{ab}	1.920±0.185 ^a	8.307±0.383 ^b	8.033±1.220 ^a
Chl a+Chl b+Car+Vt C-50	2.714±0.466 ^{ab}	11.710±0.536 ^d	15.541±1.240 ^{de}	13.818±0.676 ^b
Chl a+Chl b+Car+Vt C-500	1.883±0.976 ^{ab}	7.402±1.547 ^b	9.211±0.795 ^{bc}	9.506±0.513 ^a

¹⁾Concentration of samples are chlorophyll a 50 ppm, chlorophyll b 25 ppm, β -carotene 50 ppm, ascorbic acid 50 or 500 ppm, respectively.

²⁾Data are mean±SD (n=3).

³⁾Values with same letter (a~e) in the same column are not significantly different (p<0.05), between samples.

이 지질 peroxy 라디칼과 반응하여 라디칼양이온을 만들면 비타민 E에 의해 소거되어질 수 있다. 비타민 C는 비타민 E 라디칼을 비타민 E로 재생시킬 수 있기 때문에 β -카로텐 양이온의 손상효과를 막을 수 있다(37). 이와 더불어 비타민 C 역시 비타민 E의 재생을 도와 체내 항산화능력을 향상시키고 superoxide anion이나 hydroxyl radical과 반응하여 생체를 보호해 준다.

본 연구에서도 클로로필의 광산화 유도를 β -카로텐보다는 비타민 C가 효과적으로 억제하였고 이때 비타민 C의 농도는 클로로필 농도의 10배일 때 효과가 있는 것으로 나타났다. Ryu 등(4)의 연구에서 빛이 존재하지 않는 조건하에서는 클로로필을 포함한 항산화물질이 풍부한 부추 및 갓김치를 섭취시킨 마우스 조직에서 효과적으로 지질과산화가 억제되어졌다. 그러나 자외선 조사 후 배추김치와 갓김치군에서는 대조군에 비해 산화가 억제되었으나 부추김치군에서는 증가하는 경향을 나타내었고, 이는 부추김치의 높은 클로로필 함량과 관련 있는 것으로 여겨진다. 즉 숙성과정 중 생성된 산에 의해 클로로필은 pheophorbide로 전환되며 클로로필에서 피톨기와 마그네슘이 제거된 pheophorbide는 클로로필보다 더 쉽게 광산화를 유발한다고 보고되어 있으므로 (38) 이로 인해 부추김치 섭취군에서 자외선 조사시 광산화가 더 많이 유발되었을 수 있었을 것이라 여겨진다. 갓김치에도 클로로필이 많이 함유되어 있으나 비타민 C의 함량이 상대적으로 더 높아 자외선에 의한 광산화를 억제한 것으로 여겨진다. 또한 비타민 C 뿐만 아니라 다른 항산화관련 페놀 화합물과 기타 생리활성 물질들 역시 광산화 억제에 관여하였을 것으로 여겨지며 이에 관한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

클로로필의 광산화에 미치는 β -카로텐과 비타민 C의 역할을 linoleic acid emulsion 모델 시스템과 피부조직 균질액을 이용하여 조사하고 이와 더불어 각각의 성분들의 조합시 일어나는 변화를 살펴보았다. Linoleic acid emulsion 모델 시스템에서 클로로필과 β -카로텐은 고농도에서 자외선 B에 의한 광산화를 촉진시키는 것으로 나타났으며 고농도의 비타민 C는 이를 억제시켰다. 갓김치에 함유되어 있는 클로로필, β -카로텐, 비타민 C 농도를 참고하여 이들을 조합하였을 때 자외선 B에 의한 광산화를 억제시켰으며 β -카로텐의 경우 단독으로 사용되었을 때에는 산화를 촉진하였으나 다른 항산화성분들과 함께 사용될 경우 항산화활성을 나타내었다. ICR mouse의 피부조직 균질액에 클로로필, β -카로텐, 비타민 C를 단독 또는 혼합하여 첨가하였을 때 클로로필 a, b 및 β -카로텐의 첨가는 광산화를 가속화시켰다. 비타민 C의 경우 50 ppm을 첨가하였을 때에는 아무런 효과를 나타내지 않았으나 500 ppm을 첨가하였을 때에는 자외선 B에 의한

광산화를 효과적으로 억제시켰다. 500 ppm의 비타민 C에 클로로필과 β -카로텐을 혼합하였을 때에도 광산화가 억제되었으며 비타민 C의 농도가 중요하게 작용하였다.

감사의 글

본 논문은 2003년도 인제대학교 부설연구소 연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Van de Leun JC. 1996. UV radiation from sunlight: summary, conclusions and recommendations. *J Photochem Photobiol B Biol* 35: 237-244.
2. Black HS. 1987. Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol* 46: 213-221.
3. Cheigh HS. 1995. Biochemical characteristics of kimchi. *J East Asian Soc Dietary Life* 5: 89-101.
4. Ryu BM, Ryu SH, Lee YS, Jeon YS, Moon GS. 2004. Effect of different kimchi diets on oxidation and photooxidation in liver and skin of hairless mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 291-298.
5. Usuki R, Endo Y, Kaneda T. 1984. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. *Agric Biol Chem* 48: 991-994.
6. Endo Y, Usuki R, Kaneda T. 1984. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. *J Am Oil Chem Soc* 61: 781-784.
7. Palozza P, Krinsky NI. 1992. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. *Methods Enzymol* 213: 403-420.
8. Jung MY, Kim SK, Kim SY. 1995. Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics and amino acid effects. *Food Chem* 53: 397-403.
9. Kim YP, Lee SC. 1987. Superoxide dismutase activities in the human skin. In *The biological role of reactive oxygen species in skin*. Hayaishi O, Imamura S, Miyachi T, eds. University of Tokyo Press, Tokyo. p 225.
10. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302-306.
11. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
12. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. 1981. Antioxidative action of indole compounds during the antioxidation of linoleic acid. *Agric Biol Chem* 45: 735-739.
13. Janero DT. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9: 515-540.
14. Kolthoff IM, Medalia AI. 1951. Determination of organic peroxides by reaction with ferrous ion. *Anal Chem* 23: 595-603.
15. Ma L, Dolphin D. 1999. The metabolites of dietary chlorophylls. *Phytochemistry* 50: 195-202.
16. Dashwood RH. 1997. Chlorophylls as anticarcinogens. *Int J Oncol* 10: 721-727.
17. Negishi T, Rai H, Hayatsu H. 1997. Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat Res* 376: 97-100.
18. Jung MY, Choe E, Min DB. 1991. Alpha-, gamma-, and delta-tocopherol effects on chlorophyll photosensitized

- oxidation of soybean oil. *J Food Sci* 56: 807-815.
19. Jung SJ, Kim GE, Kim SH. 2001. The changes of ascorbic acid and chlorophylls content in gochu-jangachi during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 814-818.
 20. Carlsson DJ, Suprunchuk T, Siles DM. 1976. Photooxidation of unsaturated oils: Effect of singlet oxygen quenchers. *J Am Oil Chem Soc* 53: 656-660.
 21. Jung MY, Min DB. 1991. Effects of quenching mechanisms of carotenoids on the photosensitized oxidation of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 68:563-568.
 22. Lee KH, Jung MY, Kim SY. 1997. Quenching mechanism and kinetics of ascorbyl palmitate for the reduction of the photosensitized oxidation of oils. *J Am Oil Chem Soc* 74: 1053-1057.
 23. Burton GW. 1989. Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr* 119: 109-112.
 24. Khopde SM, Priyadarsini KI, Mukherjee TM, Kulkarni PB, Satav JG, Bhattacharya RK. 1998. Does β -carotene protect membrane lipid from nitrogen dioxide? *Free Rad Biol Med* 25: 66-71.
 25. Peterson K. 1996. Natural cancer prevention trial halted. *Science* 271: 441.
 26. Andersen HR, Andersen O. 1993. Effects of dietary α -tocopherol and β -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacology & Toxicology* 73: 192-201.
 27. Lomnitsky L, Grossman S, Bergman M. 1997. *In vitro* and *in vivo* effects of β -carotene on rat epidermal lipoxygenase. *Int J Vitam Nutr Res* 67: 407-414.
 28. Palozza P. 1998. Prooxidant actions of carotenoids in biological systems. *Nutrition Reviews* 56: 257-265.
 29. Wells WW, Jung C. 1997. Regeneration of vitamin C. In *Vitamin C in health and disease*. Packer L, Fuchs J, eds. Marcel Dekker, Inc., New York. p 109-121.
 30. Packer JE, Slater TF, Willson RL. 1979. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738.
 31. Truscott TG. 1996. β -Carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. *J Photochem Photobiol* 35: 233-235.
 32. Chamberlain J, Moss SH. 1987. Lipid peroxidation and other membrane damage produced in *Escherichia coli* K 1060 by near-UV radiation and deuterium oxide. *Photochem Photobiol* 45: 625-630.
 33. Erden Inal E, Kahraman A. 2000. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 154: 21-29.
 34. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H. 1993. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 331: 304-306.
 35. Offord EA, Gauthier JC, Avanti O, Scaletta C, Runge F, Kramer K, Applegate A. 2002. Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosis acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Rad Biol Med* 32: 1293-1303.
 36. Applegate LA, Luscher P, Tyrell RM. 1991. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 51: 974-978.
 37. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am J Clin Nutr* 62: 1322S-1326S.
 38. Ravindra KP, Fuu YS, Adam BS, Thomas JD, Kevin MS. 1992. Structure/activity relationships among photosensitizers related to pheophorbides and bacteriopheophorbides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2: 491-496.

(2004년 9월 7일 접수; 2004년 12월 21일 채택)