

멍게껍질 카로테노이드의 색조 화장품 원료의 항산화, 항염증 기능성 평가

티카버나데스, 로마줄리아티, 바티든몽크자갈, 박시향¹, 최병대*

Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Ascidian Tunic Carotenoids As a Source of Color Cosmetics

Bernadeth Ticar, Zuliyati Rohmah, Munkhjagal Bat-Erdene, Si-Hyang Park¹, and Byeong-Dae Choi*

접수: 2012년 9월 25일 / 게재승인: 2013년 2월 25일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Carotenoids are fat-soluble red-orange colored pigments found in plants and seafood-derived products, including algae, seaweeds, and fish muscle. In this study, we have demonstrated the molecular mechanism underlying the anti-oxidants and anti-inflammatory properties of ascidian tunic carotenoids using mouse macrophage cell line (RAW 264.7). Cell viability was not affected by treatment of carotenoids < 10 µg/mL. This treatment also showed negative inhibition on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The DPPH radical scavenging activity of carotenoids was 47.2% at 100 mg/mL. It also has a potential reducing power (1.025) comparable with ascorbic acid (1.584). The ascidian tunic carotenoids would make a candidate for the commercially interesting biologically active cosmetic pigments.

Keywords: Ascidian tunic carotenoids, DPPH radical, color cosmetics, NO, COX-2

경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소
Department of Seafood Science and Technology/The Institute of
Marine Industry, Gyeongsang National University, 38 Cheondaeguk-
chi-gil, Tongyeong 650-160, Korea
Tel: +82-55-772-9147, Fax: +82-55-648-2038
e-mail: bdchoi@gnu.ac.kr

¹선마린바이오테크
¹Summarine Biotech Co., 38 Cheondaegukchi-gil, Tongyeong 650-160,
Korea

1. 서론

노화란 세포와 신체조직 전 기관에 걸쳐 일어나는 기능적, 구조적, 생화학적 변화라 할 수 있다. 인간의 피부는 시간이 지남에 따라 호르몬 분비가 감소하고, 면역세포의 기능과 활성이 저하되어 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되어 생기는 내인성 노화 (intrinsic aging)와 외적으로 오염된 공기와 약물, 자외선 등에 의해 생기는 광노화 (photo aging)에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되고, 탄력이 감소될 뿐만 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 된다 [1,2]. 특히 자외선에 의한 광산화적 피부손상은 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의해서 매개되며, 항산화제 고갈, 지질 과산화, 단백질 산화 및 DNA의 산화적 손상의 결과를 가져온다. ROS란 반응성이 매우 큰 1O_2 및 $\cdot OH$ 을 비롯하여 O_2^- , H_2O_2 , ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} , $ROOH$ 및 $HOCl$ 등을 말한다. ROS 중에서 특히 1O_2 및 $\cdot OH$ 은 피부의 광 손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 ROS는 효소적 그리고 비효소적 항산화제로 이루어진 피부 항산화 방어망을 붕괴시키고 생체분자의 산화적 변형, 피부 장벽의 손상과 결합 조직 성분인 콜라젠, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성 등 피부노화를 가속시킨다 [3-5].

최근 들어 생활수준이 향상되고, 자연친화적인 생활과 환경에 대한 관심이 높아지면서 아름다움을 연출하는 외관을 꾸밀 때도 되도록 천연소재로 장식하고자 하는 욕구가 강해지고 있다. 더욱이 합성색소의 인체에 대한 발암성과 위험성이 끊임없이 제기되면서 천연색소에 대한 관심이 더욱 증대

되고 있다 [6,7]. 천연색소는 합성색소에 비해 환경오염에 미치는 영향이 적고 인체에 대한 독성이 현저히 낮으며 항균, 항암, 항염 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다 [8-10]. 또한 색상이 자연스럽고 우아하며 변색 또는 퇴색이 되어도 색감이 안정적이어서 은은한 색상을 낼 수 있을 뿐만 아니라 재료의 성질에 따라 다양한 색상을 얻을 수 있다는 장점이 있다 [11]. 그러나 천연색소는 공급되는 재료가 다양하지 못하여 생산성은 낮은 반면 가격은 높아 그 활용도가 제한적인 문제점이 있다. 그리고 색상의 발색능력 및 용해성 또한 떨어지고 열, 빛 및 pH 등의 환경 요인에 따라 색소의 안정성이 떨어진다는 단점을 지니고 있다 [12].

명계껍질에는 alloxanthin (31.3%), halocynthiaxanthin (15.5%), astaxanthin (7.8%) 등을 비롯한 약 13종의 카로테노이드가 함유되어 있고 [13], 명계껍질 카로테노이드 색소가 무지개송어 착색 및 성장에 영향을 미쳤으며 [14], 명계로부터 추출된 물질이 항산화효과 및 비만예방효과 [15]를 갖는 등 명계와 관련된 많은 연구가 이루어졌다. 따라서 본 연구에서는 명계껍질 카로테노이드의 항산화활성 및 염증억제 효능을 비교 분석함으로써 향후 이 소재를 활용한 천연 색소화장품 개발 가능성에 대한 기초자료를 제공하여 천연색소의 이용성을 증대시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 카로테노이드 색소추출 및 함량 측정

명계껍질 카로테노이드 색소추출은 동결 저장된 명계껍질을 해동시킨 후, 일정량의 시료에 3배량의 acetone을 가하고 하룻밤 실온에 방치한 다음 색소 성분을 추출여과하는 조작을 3회 반복하여 시료로부터 색소를 충분히 용출시켰다. 여과된 acetone 추출물을 회전진공증발농축기로 40°C 이하에서 농축한 후, 분액여두로 옮기고, 여기에 ether를 가하여 색소성분을 전용시킨 후, 다시 회전진공증발농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하여 카로테노이드 색소추출물로 하였다. 총 카로테노이드 함량은 460 nm에서 McBeth [16]의 방법에 따라 UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Kyoto, Japan)로 측정하였다.

2.2. 페놀화합물 측정

페놀화합물의 함량은 Folin-Ciocalteu 법 [17]에 준하여 측정하였다. 명계껍질 50 g에 ethanol, methanol, ethyl acetate 및 acetone 150 mL를 각각 첨가한 다음 25°C에서 5시간 추출하는 과정을 3회 반복하여 추출액을 모아 여과하였다. 여과된 추출액은 감압농축기에서 감압농축 한 다음, 각각의 용매 5 mL에 녹여 -20°C 냉동고에 저장하였다. 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 저장된 각 시료를 30 µL씩 넣고 10% Folin 시약 150 µL를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분 동안 실온에 방치하였다. 여기에 7.5% Na₂CO₃ 120 µL를 첨가한 후 40°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 765 nm에서 흡광도를 측정하였

으며, 총 페놀성 화합물의 함량은 gallic acid (G7384-100G, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 대한 동일 양으로 계산하였고 blank는 동일시약에 시료 대신 탈 이온수를 첨가한 것을 사용하였다.

2.3. DPPH 라디칼 소거활성 측정

명계껍질 카로테노이드 색소 추출물을 ethanol 0.1, 1.0, 10 및 100 mg/mL의 농도로 용해하였다. 96 well plate 시험관에 시료 용액 100 µL와 100 µL의 ethanol을 가하고, 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)/ethanol 용액 50 µL를 첨가하였다. 25°C의 실온에서 30분 동안 방치한 후, UV/VIS spectrophotometer (Spectramax M2 Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 100 µL의 ethanol을 사용하였다. 또한 시료 용액 100 µL와 150 µL ethanol을 혼합하여 흡광도를 측정한 후 시료의 흡광도를 보정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 0.01-10 mg/mL 농도로 녹여 같은 방법으로 라디칼 소거능을 비교하였다 [18].

2.4. 환원력 측정

Ethanol에 각 농도로 녹여 제조한 명계껍질 카로테노이드 0.3 mL를 시험관에 넣고 0.7 mL의 50 mM phosphate buffer (pH 6.6)와 0.5 mL의 1% potassium ferricyanide 용액을 넣은 다음 50°C에서 20분 동안 반응을 시켰다. 여기에 단백질을 제거하기 위해 0.5 mL의 10% TCA 용액을 첨가하고 5,000 × g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액 0.5 mL를 취해 0.5 mL의 탈이온수와 0.1 mL의 0.1% ferric chloride 용액을 첨가하고 10분 후 UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1700)로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 [19].

2.5. 세포배양 및 세포독성 측정

실험에 사용된 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양받아 실험에 사용하였다. DMEM (VWR International Inc., Logan, UT, USA) 배지를 사용하였고, 각 세포주는 10 cm plate에서 배양하여 3일마다 계대 배양하였으며, 배양배지는 10% FBS와 5% penicillin/streptomycin을 함유한 성장배지로 배양하였다. 세포주는 습도 95%, CO₂ 5% 하에서 35°C로 조절된 incubator에서 배양하였으며, 배지는 2-3일에 한번 씩 교환해 주었다. 명계껍질 카로테노이드의 세포독성을 측정하기 위하여 세포 배양용 플라스크에 배양한 RAW 264.7 세포주 10 mL를 플라스크에서 떼어내어 계대하였고, DMEM 배지로 배양하였다. RAW 264.7 세포주를 1 × 10⁴ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고, 24시간 동안 35°C, 습도 95%, CO₂ 5%로 조절된 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 새로운 배지에 시료의 농도가 25, 50, 100 및 200 µg/mL이 되도록 조절하여 세포주에 24시간 동안 처리하였다. 여기에 세포의 생존능을 알아보기 위하여 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 시약을 1시간 동

안 처리한 후 formazan의 생성 정도를 microplate reader (Perkin Elmer 1420, VICTOR™ Multilabel Plate Readers, Waltham, MA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료 미처리 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다 [20].

2.6. Nitric oxide (NO) 생성 억제능 측정

명계껍질 카로테노이드의 염증 억제효능은 RAW 264.7 세포를 사용하여 Green 등 [21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 10% (v/v) FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 포함하는 DMEM 배지로 세포를 96 well에 분주하여 세포가 70-80% 정도 well에 성장하였을 때, LPS (lipopolysaccharide, 100 sng/mL)와 함께 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배양 상징액 50 µL를 취하여 Griess 시약 50 µL와 5분간 반응 시킨 후, microplate reader (Perkin Elmer 1420)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 생성량은 LPS 만을 처리한 대조군의 생성량에 대한 LPS와 시료 처리군의 생성량을 백분율로 나타내었다.

2.7. COX-2 저해 활성 측정

COX-2 저해 활성 측정은 COX activity assay kit (Cayman Chemical Co. Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 실험하였다. 시료 20 µL에 hematin 10 µL, 효소 5 µL, buffer 950 µL를 넣고 37°C에서 반응 후 10 µL의 arachidonic acid를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 COX-2를 활성화시킨 후 이를 50 µL를 취하고 200 µL의 시료를 넣은 후 25°C에서 90분간 반응시킨 후 ELISA autoreader (UVN340, Biochrom Ltd., Holliston, MA, USA)를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. COX-2의 활성 계산은 총 COX의 활성에 COX-1의 활성을 제하여 계산하였다 [22].

2.8. 통계학적 분석

모든 실험은 3회 반복실험을 거쳤고, 결과의 통계처리는

$$\text{Total COX activity (nmol/min/mL)} = \frac{\text{흡광도 (590 nm)} \times 0.21}{0.00826^{-1} \times 0.04} / 2$$

JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하였으며, 각각의 시료에 대해서는 평균 ± 표준편차로 나타냈다. 각 시료에 대한 유의차 검정은 One-way ANOVA test를 실시하여 분산분석한 후, Duncan's multiple range test에 의해 정직유의 차검정법을 활용하여 유의차 검정 ($P < 0.05$)을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 라디칼 소거 활성능

명계껍질 카로테노이드의 라디칼 소거 활성능을 DPPH 시약으로 측정하여 Table 1에 나타내었다. 생체 내의 물질대사에 의하여 발생하는 활성산소는 체내의 항산화시스템에 의

Table 1. DPPH radical scavenging activity of ascidian tunic carotenoids (ASTC)

Sample (mg/mL)	Radical scavenging activity (%) ¹⁾	
Control	100.0 ± 1.9	
Ascorbic acid	0.01	41.6 ± 6.0 ^b
	0.1	56.6 ± 2.4 ^b
	1.0	93.5 ± 0.4 ^a
	10.0	94.6 ± 0.8 ^a
ASTC	0.1	33.2 ± 2.1 ^d
	1.0	35.9 ± 2.0 ^d
	10.0	41.3 ± 10.9 ^{cd}
	100.0	47.2 ± 14.6 ^c

Results are represented as mean ± SEM on three measurements.

¹⁾Any two means having a common letter are not significantly different at the 1% level of significance.

하여 제거되지만, 스트레스 등에 의하여 과다하게 발생하는 활성산소는 세포막에 있는 불포화지방산과 결합하여 지질과산화물을 야기하여 세포 내 구조적, 기능적 피해를 가져다 준다. 이러한 지질과산화를 일으키는 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력인 DPPH의 전자공여능을 측정하는 방법을 이용하여 천연물질의 항산화 활성을 조사하는 방법이 많이 이용되고 있다 [23]. 라디칼 소거 활성능을 비교하기 위해 양성 대조군으로 ascorbic acid를 0.01-10 mg/mL의 농도로 하여 시료와 같은 방법으로 동시에 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 ascorbic acid 1 mg/mL에서 90%가 넘는 라디칼 소거 활성능을 보여 주었으며, 라디칼이 50% 저해되는 농도 (IC₅₀)는 0.023 mg/mL이었다. 명계껍질 유래의 카로테노이드는 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거 활성능이 약간 증가하였으나, 고농도인 100 mg/mL에서도 47.2%의 저해능을 보여주어 라디칼 소거 활성능은 ascorbic acid에 미치지 못하는 듯하였다.

명계껍질에서 얻어진 카로테노이드와 천연색소 원료로 개발되고 있는 파프리카, 양파껍질, 적양배추, 포도과피의 DPPH 라디칼 소거능과 비교할 때 같은 1.0 mg/mL의 농도에서 35.9%의 소거능을 보여주어 파프리카 등의 농산물 천연색소원 73.0-79.8%보다 훨씬 낮은 소거능을 나타내었다. 이는 농산물 색소원에 함유된 페놀성 화합물의 농도가 높은 것이 그 원인으로 보고되었다 [6,24]. 특히 식물성 붉은 색소원인 anthocyanin의 DPPH 라디칼 소거능은 α-tocopherol과 유사한 높은 항산화력을 나타내었지만, 명계껍질 카로테노이드는 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다 [25].

3.2. 환원력에 의한 항산화 효과

Ferricyanide를 이용한 명계껍질 카로테노이드의 환원력을 측정한 결과, 0.1 mg/mL부터 10 mg/mL까지 농도가 증가함에 따라 환원력이 크게 증가하여 1.025에 이르렀으나 ascorbic acid 10 mg/mL보다 낮은 값을 나타내었다 (Table 2). 비교 대조군인 ascorbic acid 10 mg/mL의 1.584와 비슷한 효능의 환원력을 나타내기 위해서는 명계껍질 카로테노이드를 10 mg/

Table 2. Reducing power and phenol contents of ascidian tunic carotenoids (ASTC) depends on solvent

Sample	Absorbance (nm) ¹⁾	Total phenolics (mg/g) ²⁾
Ascorbic acid	0.01 mg/mL	0.162 ± 0.003 ^c
	0.1 mg/mL	0.430 ± 0.000 ^d
	1.0 mg/mL	0.536 ± 0.002 ^c
	10.0 mg/mL	1.584 ± 0.007 ^a
ASTC	0.1 mg/mL	0.009 ± 0.001 ^h
	0.5 mg/mL	0.094 ± 0.003 ^g
	1.0 mg/mL	0.203 ± 0.008 ^f
	10.0 mg/mL	1.025 ± 0.055 ^b
Ethyl acetate extract		1.178 ± 0.083 ^d
Ethanol extract		1.676 ± 0.041 ^b
Methanol extract		1.740 ± 0.168 ^a
Acetone extract		1.381 ± 0.078 ^c

Results are represented as mean ± SEM on three measurements.

¹⁾Any two means having a common letter are not significantly different at the 1% level of significance.

²⁾Miligrams of total phenolic content/g of carotenoids based on gallic acid standard.

mL 이상 첨가하여야 할 것으로 여겨진다. 활성 산소는 연쇄적으로 일어나는 자동산화 반응의 촉진제로 자동산화 반응 중에 생성되는 자유라디칼에 수소 원자를 공여함으로써 반응을 종결시킨다. 이와 같이 전자를 공여하는 환원력이 높을수록 강력한 항산화제가 되므로 적은 양으로 높은 환원력을 갖는 물질을 화장품 제조의 원료로 사용하는 것이 효과적일 것이다. Youn 등 [26]은 눈개승마 추출물의 피부노화를 억제시키는 항산화 효과와 피부탄력 및 주름 개선에 관련된 콜라겐 생합성 촉진 및 분해억제 효능을 평가하여 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하고자 ethanol 및 물로 추출하여 환원력을 평가한 결과 ethanol 추출물 2 mg/mL 농도에서 1.58의 환원력을 나타내어 물 추출물보다 높은 환원력을 나타내었다고 하였다. Total phenolic 화합물의 농도가 높을수록 환원력에 의한 항산화활성과 가장 높은 상관관계를 나타내었다고 보고한 Auezova 등 [27]의 연구결과를 확인하기 위하여 멍게껍질 카로테노이드에 함유된 phenol 함량을 측정하였다(Table 2). 추출용매에 따라 차이가 있어 ethyl acetate 가 1.178 mg/g으로 가장 낮은 함량은 보였고, methanol이 가장 높은 1.740 mg/g을 나타내었다. 이는 눈개승마 추출물의 122.6 mg/g과 갈조류 *Saccharina bongardiana*의 7.08 mg/g보다 현저히 낮은 함량을 보여주었고 재료의 특성과 분석방법에 따라 phenol 함량에 큰 차이를 보여 주는 것으로 나타났다.

3.3. RAW 264.7 cell line에 대한 독성시험

염증 억제 효능은 대식세포주인 RAW 264.7 cell을 배양하여 측정하였다 (Fig. 1). 시료의 농도를 달리하여 색소의 세포 독성을 측정한 후 독성이 없는 농도에서 항염증 효능을 측정하였다. 대식세포주에 대한 독성시험에서 100 µg/mL의 고

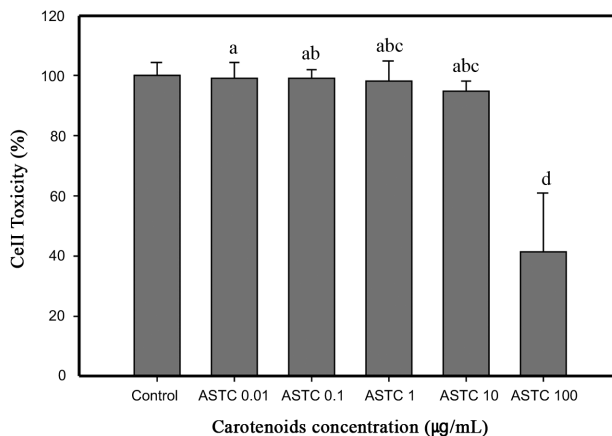


Fig. 1. Cell (RAW 264.7) toxicity of ascidian tunic carotenoids (ASTC). Values are mean with standard error of triplicates. Any two means having a common letter are not significantly different at the 1% level of significance.

농도에서 세포가 60% 정도 사멸하였으며, 10 µg/mL의 저농도에서는 통계적으로 유의적인 세포 독성은 나타나지 않았다.

3.4. NO 생성 억제 활성

멍게껍질 카로테노이드의 항염증 효능을 NO 생성량의 저해 정도로 측정하여 Table 3에 나타내었다. LPS는 NO 생성과 염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 물질로 염증 유발 인자로 사용된다. 일반적인 NO 생성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하는 역할을 하나 과도한 생성은 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상을 일으키기도 한다 [28]. 대조군은 LPS와 시료 모두를 첨가하지 않았고, 양성 대조군으로는 LPS만을, 시험군에는 LPS와 시료를 농도별로 처리하여 NO 생성의 저해능을 비교하였다. LPS를 처리한 세포는 미처리 세포에 비하여 NO의 생성량이 3배 정도 높았으며, LPS만을 처리한 양성 대조군의 NO 생성량과 멍게껍질 카로테노이드의 NO 생성량을 비교한 결과, NO 생성량은 색소 추출물 10 µg/mL에서 약 5%의 저해 활성을 보여주었으나, 모든 농도에서 유의적인 억제효과는 확인할 수 없었다. RAW 264.7

Table 3. Inhibitory effects of ascidian tunic carotenoids (ASTC) on NO production by LPS

Sample	NO formation(%) ¹⁾
Control	38.3 ± 2.1
LPS 100 ng/mL	100.0 ± 3.7
ASTC 0.01 µg/mL + LPS 100 ng/mL	98.5 ± 3.0 ^{ab}
0.1 µg/mL + LPS 100 ng/mL	98.0 ± 3.8 ^{abcd}
1.0 µg/mL + LPS 100 ng/mL	99.0 ± 6.0 ^a
5.0 µg/mL + LPS 100 ng/mL	98.0 ± 4.4 ^{abc}
10.0 µg/mL + LPS 100 ng/mL	95.0 ± 7.2 ^{abcd}

Results are represented as mean ± SEM on three measurements.

¹⁾Any two means having a common letter are not significantly different at the 1% level of significance.

Table 4. COX-2 inhibition activity of ascidian tunic carotenoids (ASTC)

Sample	COX-2 formation (nmol/min/mL) ¹⁾
Control	6.97 ± 0.30
LPS 100 ng/mL	8.30 ± 2.31
ASTC 0.01 µg/mL + LPS 100 ng/mL	8.12 ± 0.39 ^a
0.1 µg/mL + LPS 100 ng/mL	8.34 ± 0.40 ^a
1.0 µg/mL + LPS 100 ng/mL	8.11 ± 0.34 ^a
5.0 µg/mL + LPS 100 ng/mL	8.25 ± 0.10 ^a

Results are represented as mean ± SEM on three measurements.

¹⁾Since ANOVA proofed there are no significant differences between treatments thus it couldn't be proceed to Duncan's multiple range test.

cell을 이용하여 LPS로 유도된 NO 생성에 대한 astaxanthin의 억제효과를 측정할 결과 10 µg/mL에서 약 36배의 NO 생성을 억제하였으며, 농도 의존적으로 NO의 생성을 유의성 있게 억제한다고 하여 멧게껍질에서 얻어진 복합 카로테노이드 보다 단일 물질인 astaxanthin의 효능이 높은 것으로 나타났다 [29].

3.5. COX-2의 저해 활성

항염증 효능을 확인하기 위하여 COX-2 생성량을 측정하여 Table 4에 나타내었다. 시료 미첨가군인 대조군 (6.97 ± 0.30 nmol/min/mL)에 비해 LPS를 처리한 시험군 (8.30 ± 2.31 nmol/min/mL)은 COX-2 생성량의 유의적인 증가가 인지되었으나, LPS와 카로테노이드를 동시에 처리한 구에서 색소농도를 증가시켰음에도 불구하고 COX-2의 농도는 8.11~8.25 nmol/min/mL 범위로 LPS 시험군과의 차이가 인지되지 않았다 ($P < 0.05$). NO 생성과 COX-2의 활성시험을 통해 멧게껍질 카로테노이드의 항염증 효능에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Anthocyanin을 주성분으로 하는 흑자색미인 흑진주벼, 흑남벼로부터 cyanidin 3-*O*-glucoside를 정제하여 항산화활성을 측정할 결과 50 µg/mL 농도에서 46.8-73.3%의 매우 높은 항산화활성을 나타내었지만, COX-1, 2에 대한 활성을 조사한 결과 12.5 µg/mL에서도 활성을 나타내지 않았다고 하여 [30], 색소성분은 항산화활성을 나타내었지만 항염증 작용은 낮은 것으로 생각된다. Rafi 등 [31]도 6종류의 carotenoids 중 가장 높은 항산화활성을 나타낸 lycopene의 iNOS 및 COX-2 억제활성을 측정할 결과 NO 생성량은 2.5-10 µM 범위에서 농도 의존적 ($P < 0.001$)으로 억제하였지만, COX-2 생성량에는 영향을 미치지 않았다고 하여 연구방법에 따른 서로 다른 결과를 보여주었으므로 더 많은 연구가 이루어져야 한다고 하였다.

4. 결론

급속한 경제성장과 생활수준의 향상은 소비자의 수요패턴

을 변화시켜 피부영양공급, 세포활성화, 피부보호 등의 기능적 요소를 선호하는 경향이 높아지게 되었다. 2008년 천연식품 추출물을 함유한 화장품 시장이 1조 원에 이르렀고, 순수 국내 자생식물을 소재로 한 화장품 시장은 1천억 원대에 이르고 있으나, 색조화장품은 대부분 수입에 의존하고 있는 실정므로 식물 추출물에 의존하고 있는 연구개발 방향을 해양생물로 다양화함으로써 원료공급을 통한 양식어민들의 소득증대에 기여할 수 있는 방안을 모색하고자 하였다.

본 연구에서는 항산화활성을 나타내는 것으로 알려진 카로테노이드 색소를 다량 함유하고 있으나 그 활용방안이 개발되지 않아 전량 폐기되고 있는 멧게껍질로부터 추출 정제한 카로테노이드의 항산화활성과 항염증 효능을 검증하였다. 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 활성을 증가하는 경향이었고, 10.0 mg/mL의 높은 농도에서는 환원력은 증가하였다. 세포를 활용한 NO 및 COX-2생성 억제력 등을 평가한 결과 실험농도의 범위에서는 효능을 나타내지 않았으므로, 이 후 혼합된 카로테노이드를 분리·정제한 후 각각의 카로테노이드에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

감사

본 연구는 농림수산식품부 수산특정연구개발사업(No. 20080027)의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Gilcrest, B. A. (1990) Skin aging and photo aging. *Dermatol. Nurs.* 2: 79-82.
- Ha, T. Y. (2006) Development of functional food materials for healthy life. *Korean J. Crop Sci.* 51: 26-39.
- Threle, J. J., C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda, and L. Packer (2001) The antioxidant network of the stratum corundum. *Curr. Probl. Dermatol.* 29: 26-30.
- Park, S. N. (2003) Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 510-516.
- Park, S. N. (2003) Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 14: 657-661.
- Boo, H. O., J. S. Shin, S. J. Hwang, C. S. Bae, and S. H. Park (2012) Antimicrobial effects and antioxidative activities of the cosmetic composition having natural plant pigments. *Korean J. Plant Res.* 25: 80-88.
- Yoo, J. G. and J. Y. Jung (2012) Studies on the repeated toxicity test of food red No.2 for 4 weeks oral administration in SD rat. *J. Fd. Hyg. Safety* 27: 42-49.
- Lee, S. M., Y. H. You, K. M. Kim, J. J. Park, C. S. Jeong, D. Y. Jhon, and W. J. Jun (2012) Antioxidant activities of native gwangyang *Rubus coreanus* Miq. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*

- 41: 327-332.
9. Boo, H. O., S. J. Hwang, C. S. Bae, S. H. Park, and W. S. Song (2011) Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Korean J. Plant Res.* 24: 105-112.
 10. Kim, S. Y. and J. A. Cho (2008) A study based on natural dyes usage shown with shade makeup. *J. Korean Soc. Cosmetol.* 14: 106-113.
 11. Park, B. R., K. S. Kim, H. R. Park, K. O. Shin, K. M. Ahn, and K. Y. Kim (2010) A study on lip-balm usability from *Lithospermum erthrohizon*. *J. Cosmetol. Sci.* 6: 239-247.
 12. Choi, J. H., J. H. Yeum, and D. K. Bae (2009) Utilization of natural plant pigments resource. *Fiber Tech. Indus.* 13: 113-121.
 13. Choi, B. D., S. J. Kang, Y. J. Choi, M. G. Youm, and K. H. Lee (1994) Utilization of ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic 3. carotenoid composition of ascidian tunic. *J. Korean Fish. Soc.* 27: 344-350.
 14. Choi, B. D., S. J. Kang, and K. H. Lee (1996) Quality improvement of rainbow trout with pigments and enzymatic hydrolysates of ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. *J. Korean Fish. Soc.* 29: 345-356.
 15. Kwon, T. H., J. K. Kim, T. W. Kim, J. W. Lee, J. T. Kim, H. J. Seo, M. J. Kim, C. G. Kim, D. S. Jeon, and N. H. Park (2011) Antioxidant and anti-lipase activity in *Halocynthia roretzi* extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 464-468.
 16. McBeth, T. W. (1972) Carotenoids from nudibranches. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B: 55-68.
 17. Skerget, M., P. Kotnik, M. Hadolin, A. Rizner Hras, M. Simonic, and Z. Knez (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 89: 191-198.
 18. Park, E. Y., H. Murakami, T. Mori, and Y. Matsumura (2005) Effects of protein and peptide addition on lipid oxidation in power model system. *J. Agric. Food Chem.* 53: 137-144.
 19. Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315.
 20. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
 21. Green, L. C., D. A. Wagner, and J. Glogowski (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
 22. Lee S. G., H. J. Jeong, E. J. Lee, J. B. Kim, and S. W. Choi (2011) Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 200-205.
 23. Leteliera, M. E., M. B. Alfredo, C. T. Juan, J. S. Jos, H. H. Marianne, P. Karina, M. Margarita, M. Dante, and G. L. Victor (2008) DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicol. Vitro.* 22: 279-286.
 24. Cha, H. S., A. R. Youn, P. J. Park, H. R. Choi, and B. S. Kim (2007) Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 683-688.
 25. Kim, Y. H., D. S. Kim, S. S. Woo, H. H. Kim, Y. S. Lee, H. S. Kim, K. O. Ko, and S. K. Lee (2008) Antioxidant activity and cytotoxicity on human cancer cells of anthocyanin extracted from black soybean. *Korean J. Crop Sci.* 53: 407-412.
 26. Youn J. S., S. Y. Shin, Y. X. Wu, J. Y. Hwang, J. H. Cho, Y. G. Ha, J. K. Kim, M. J. Park, S. H. Lee, T. H. Kim, and T. W. Kim (2012) Antioxidant and anti-wrinkling effects of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* extract. *Korean J. Food Preser.* 19: 393-399.
 27. Auezova, L., F. Najjar, O. Selivanova, E. H. Moussa, and M. D. Assaf (2012) Antioxidant activity of brown alga *Saccharina bongardiana* from Kamchatka (Pacific coast of Russia). A methodological approach. *J. Appl. Phycol.* 24: 1373-1380.
 28. Lee, T. H., H. B. Kwak, H. H. Kim, Z. H. Lee, D. K. Chung, N. I. Baek, and J. Kim (2007) Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kB transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol. Cells* 23: 398-404.
 29. Kwak, T. W., J. Y. Cha, C. W. Lee, Y. M. Kim, B. H. Yoo, S. G. Kim, J. M. Kim, S. H. Park, and W. G. An (2011) Anti-inflammatory and antioxidant effect of astaxanthin derived from microalgae. *J. Life Sci.* 21: 1377-1384.
 30. Park, S. Z. and S. N. Ryu (2006) Free radical scavenging and inflammatory from the rice varieties contained high C3G pigment. *Korean J. Crop Sci.* 51: 107-112.
 31. Rafi, M. M., P. N. Yadav, and A. A. Reyes (2007) Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. *J. Food Sci.* 72: S69-S74.