

미역에 함유된 Fucoxanthin 색소의 추출 및 특성

김선재[†] · 김현주 · 문지숙 · 김정목 · 강성국 · 정순택

목포대학교 생명공학부 및 식품산업기술연구센터

Characteristic and Extraction of Fucoxanthin Pigment in *Undaria pinnatifida*

Seon-Jae Kim[†], Hyun-Ju Kim, Ji-Sook Moon, Jeong-Mok Kim,
Seong-Gook Kang and Soon-Teck Jung

Faculty of Biotechnology and Food Industrial Technology Research Center,
Mokpo National University, Jeonnam 534-729, Korea

Abstract

The contents of fucoxanthin in *Undaria pinnatifida* blade, stem and sporophyll were 87.6 mg/100 g, 62.4 mg/100 g and 127.7 mg/100 g, respectively. The fucoxanthin was analysed by using solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography and HPLC techniques. Absorption spectrum of carotenoids extracted from *Undaria pinnatifida* was similar to the fucoxanthin carotenoids in sea mustard. The cleavage products formed by autoxidation of fucoxanthin were evaluated in order to elucidate possible oxidation products of fucoxanthin in liposomal suspension. Fucoxanthin solubilized at 50 μ M in liposomal suspension formed five oxidized products. These results suggest that fucoxanthin might be cleaved to a series of cleavage products under the oxidative condition in liposomal suspension.

Key words: *Undaria pinnatifida*, fucoxanthin, autoxidation, cleavage products

서 론

해조류는 미네랄, 비타민, 식이섬유 등의 높은 영양적 가치를 지니고 있으며 항산화제로서의 역할을 담당할 수 있는 물질이 다량 함유되어 있다. 항산화제는 세포를 공격하는 위험한 활성산소 라디칼을 중화시켜주고, 심장병, 암 발생의 예방에 기여한다(1) 미역(*Undaria pinnatifida*)은 갈조류(Brown algae)의 곤포과에 속하는 1년생 해조류로서 칼슘, 칼륨, 철분, 요오드 등의 무기질 성분, 각종 비타민 등의 영양성분과 정미성분이 함유되어 있고(2,3), 최근 생리활성 물질로서 각광을 받고 있는 항암효과가 있는 것으로 밝혀진 fucoidan과 미역의 세포막 구성성분으로 다량 존재하는 alginic acid 등의 산성 다당류가 대량으로 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(4-6). 특히 alginic acid는 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid가 동일 분자 내에 β -1,4 결합을 하고 있는 직쇄상의 복합다당류로 콜레스테롤 배출 작용, 중금속(Cd), 방사능 물질(Sr)의 체내 흡수 억제 및 배출 작용과 정장작용이 있어 식이섬유로서 효과가 알려져 있다(7,8).

그리고 미역 등 갈조류에는 fucoxanthin이라는 carotenoid 색소가 함유되어 있다. 일반적으로 carotenoids는 지용성이

며 공액 이중 결합수가 많을수록 황색에서 적색으로 이행하는 것으로 알려져 있으며 불포화도가 매우 높기 때문에 열, 산, 광조사, 금속이온, 과산화물, peroxidase 및 화학약품 등에 의해서 쉽게 산화되어 파괴되며, 300~500 nm의 파장에서 특성의 흡수대를 가지는 특성이 있다(9) 그러나 carotenoids는 광선에 의해서 유발되는 광 감광 산화반응에 있어서 활성화된 일중항 산소와 반응하여 전체적인 반응의 진행을 억제하고(10), free radical 반응의 억제기작에 의해 발생하는 활성산소로부터 세포와 조직을 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(11). 한편 활성산소는 핵산, 단백질, 지질 등에 산화적 장애를 일으켜 염증, 노화, 암 등 다양한 질병을 유발시키는데(12), 이러한 작용도 carotenoids의 산화억제 작용에 의해 저지되어 생물학적으로 매우 중요한 의미를 가지며, 생물체의 항산화효소, 토코페롤 등의 항산화제와 더불어 생체방어 역할을 하고 있다. 뿐만 아니라 carotenoids는 동물의 번식 촉진, 성장률개선, 질병발생 억제, 어육의 색상개선 등 유용한 기능성을 나타내는 것으로 알려지고 있어 의약품, 사료, 건강식품 등에 이용가치가 클 것으로 기대되고 있다(13,14)

미역색소 fucoxanthin의 기능성 연구는 신경 아세포 배양

[†]Corresponding author. E-mail: foodkim@mokpo.ac.kr
Phone: 82-61-450-6453, Fax: 82-61-454-1521

액 중에 첨가시 신경 아세포의 증식이 완전히 저해되거나 증식속도가 저하하여 강력한 항종양활성을 갖는 물질로 평가되고 있으며(15), 마우스 피부 2단계 발암시험에서 fucoxanthin을 발암 promotor 처리시 동시에 도포하여 강력하게 종양 발생을 억제하였고, 십이지장 종양에 대해서도 유의한 억제 효과(16)를 보고하고 있다. 그리고 fucoxanthin의 대사산물인 haloacynthiaxanthin은 fucoxanthin보다 강력한 항종양 활성을 나타내고 있다고 보고되고 있다(17).

본 연구에서는 새로운 미역 가공제품의 생산 및 고부가가치 제품의 생산을 위한 기초자료를 제공하고자 미역으로부터 fucoxanthin을 추출, 정제과정을 정립한 후 fucoxanthin의 산화물의 생성경향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Fucoxanthin색소의 추출에 사용한 미역엽, 미역줄기, 미역귀는 2001년 전남 목포와 완도의 시장에서 구입하여 동결 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 사용하였다. Fucoxanthin 자동산화의 기질로 사용된 인지질(dimyristoyl phosphatidylcholine)은 Sigma사(Sigma, ST. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Fucoxanthin의 추출 및 용매분획

미역으로부터 fucoxanthin의 추출은 Haugan 등(18)의 방법을 약간 변형하여 추출하였다(Fig. 1). 건미역의 부위별 분말 500 g을 3배량(w/v)의 용매(Acetone : methanol = 7 : 3, v/v)로 추출하고 암소에 2일간 방치 후 homogenizer로 균질화시킨 다음, 감압 여과하고 얻어진 여과액에 대해 rotary evaporater를 이용하여 농축하였다. 농축물은 *n*-hexane 200 mL와 90% methanol 200 mL를 용매계로 하여 분획하고,

90% methanol 층에 대해서는 동량의 *n*-hexane으로 3반복 용매분획하였다. 얻어진 90% methanol층에 대해서는 증류수를 가하여 70% methanol로 제조하여 *n*-hexane으로 3반복 용매분획한 후 얻어진 70% methanol 획분을 감압 농축하였다. 상기의 용매분획을 통하여 얻어진 70% methanol 획분은 동결건조하고 무게를 측정하였으며 미역의 부위별 fucoxanthin 함량을 비교하였다.

상기의 *n*-hexane획분과 70% methanol획분은 UV-vis spectrophotometer(Hewlett Packard, 8452A, USA)를 이용하여 각각의 spectrum을 조사 비교하였다.

Fucoxanthin의 정제

상기의 fucoxanthin획분에 대하여 silica gel adsorption chromatography를 행하였다. 즉, silica gel(10 g, 63-200 mesh, column chromatography용, Merk Co.)를 *n*-hexane : acetone(7 : 3 v/v)를 용매계로 slurry를 만들어 column에 충전시킨 후, 용출시키고 용출된 각각의 획분에 대해 fucoxanthin의 전형적인 spectra를 나타내는 획분만을 모으는 방법으로 정제하였다.

Fucoxanthin의 자동산화

얻어진 fucoxanthin의 안정성은 Kim 등(19)과 Kim(20)의 방법을 참고하여 인지질 acetone 용액 1 mL와 dichloromethane에 용해된 50 μ M fucoxanthin을 시험관에 넣어 혼합하고 질소 gas로 휘발시켰다. 용매가 완전히 제거된 고형물에 대해 초순수 1 mL로 용해하였다. Fucoxanthin이 함유된 각각의 용액은 황색등하에서 37°C, 72시간 진탕시키면서 함량의 변화를 측정하였다.

Fucoxanthin의 중간산물의 추출을 위해 자동산화 반응액 1 mL에 대하여 hexane 2 mL로 3회 추출하였다. 모아진 hexane 층을 회전감압농축기를 이용하여 농축하고 질소 gas로 완전히 휘발시켰다. 용매가 완전히 제거된 고형물을 hexane-ethylacetate(99 : 1, v/v) 300 μ L로 용해하고 Bond Elut solid phase cartridge(SI 100 mg, Varian, Harbor, USA)에 주입하였다. 시료가 주입된 cartridge에 hexane-ethylacetate(99 : 1, v/v) 1 mL로 용출하고 이어 hexane : ethylacetate(95 : 5, v/v) 3 mL로 용출한 후 이 획분을 carbonyl 화합물 획분으로 하고 용출액을 농축한 다음 acetonitrile 200 μ L로 용해하여 그 중 100 μ L를 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

HPLC 분석

미역으로부터 추출된 fucoxanthin의 HPLC 분석은 Jasco CO-965 thermostat(40°C)안에 장착된 silica gel column(Spherisob, gel size 5 μ m, 4.6 \times 250 mm)을 사용하였으며 검출기는 Jasco UV-975(UV/Vis Detector, Japan), 유속은 1.0 mL/min의 조건으로 하였다. Fucoxanthin의 분석을 위한 용출용매는 isocratic solvent인 chloroform : acetone(9 : 1, v/v)로 용출하였다. Fucoxanthin의 산화물에 대한 분석시 용출용매는 0.1% ammonium acetate 함유 acetonitrile : meth-

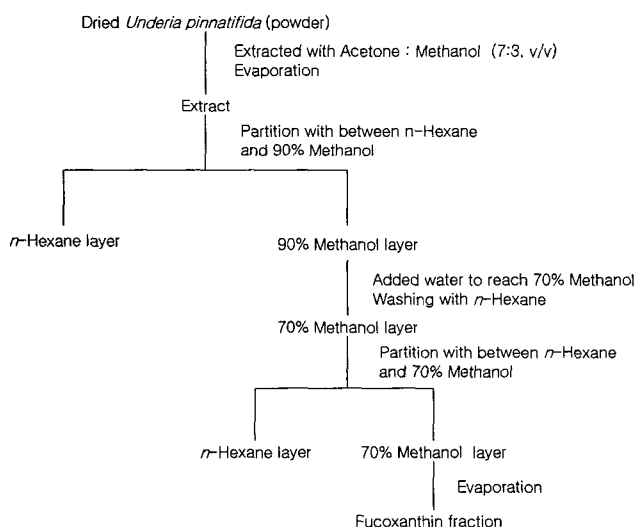


Fig. 1. Flow diagram for the preparation of fucoxanthin from *Underia pinnatifida*.

anol : water(75 : 15 : 10, v/v/v)와 0.1% ammonium acetate 함유 methanol : ethylacetate(70 : 30, v/v)의 두 용매를 10분간 linear gradient시켜 분석하였다.

결과 및 고찰

미역의 부위별 fucoxanthin 함량

미역의 부위별 fucoxanthin의 함량을 측정하기 위하여 미역 각 부위를 동결건조하고 얻어진 분말에 대하여 Fig. 1의 방법으로 추출하였다. 미역분말의 추출 및 용매분획 과정 중에 얻어진 각 획분에 대해서 spectra를 측정하여 444 nm에서 최대흡수극대를 나타내는 전형적인 fucoxanthin의 분광학적 특징을 나타내는 부분만을 fucoxanthin획분으로 하였다.

미역 각 부위의 fucoxanthin 함량은 Table 1에 나타난 것처럼 미역엽에 87.6 mg/100 g, 미역줄기에 62.4 mg/100 g 그리고 미역귀에 127.7 mg/100 g을 나타내어 미역귀에 함유되어 있는 fucoxanthin함량이 미역잎에 비해 1.4배, 미역줄기에 비해 2.0배 더 함유되어 있는 것으로 나타났다. Yan 등(21)은 10여종의 해조식물을 대상으로 fucoxanthin의 항산화 활성을 측정된 결과, 툃과 미역 추출물에서 항산화 활성이 가장 우수하였고 이어 미역귀, 미역엽, 미역줄기 순인 것으로 밝혔으며 이것은 해조식물이 함유하고 있는 fucoxanthin 함량과 밀접한 관계가 있음을 보고하였다.

Fucoxanthin의 분광학적 특성

상기의 부위별 미역으로부터 추출한 fucoxanthin획분의 색소조성에 대한 정보와 정제를 목적으로 silica gel column chromatography를 행하였다. Fucoxanthin색소는 Fig. 2에 나타난 것처럼 *n*-hexane : acetone(7 : 3 v/v)용매계로 용출, fucoxanthin의 최대흡수극대인 444 nm에서 모니터하면서 fucoxanthin 색소라고 인정되는 각각의 획분을 모아 농축하였다. Fucoxanthin의 분광학적 특성은 Fig. 3에 나타난 것처럼 444 nm에서 최대흡수를 나타내는 전형적인 carotenoids의 특성을 나타내었다. Haugan 등(18)은 fucoxanthin이 해조류 중 Chromophyta속, Chrysophyceae속, Prymnesiophyceae속, Phaeophyceae속에 함유되어 있고, 대부분 갈조류에 다량 함유되어 있는 것으로 보고하였다. 또한 fucoxanthin색소의 분광학적 특징은 420 nm, 444 nm, 467 nm에서 흡수특성을 나타낸다고 보고하여 본 연구에서 얻어진 fucoxanthin색소의 분광학적 특성과 잘 일치하여 미역의 carotenoid

Table 1. Fucoxanthin content extracted from *Undaria pinnatifida*

<i>Undaria pinnatifida</i>	Fucoxanthin content (mg/100 g, dry basis)
Blade	87.6 ± 3.3 ¹⁾
Stem	62.4 ± 1.3
Sporophyll	127.7 ± 6.3

¹⁾ Mean ± SD (n=3).

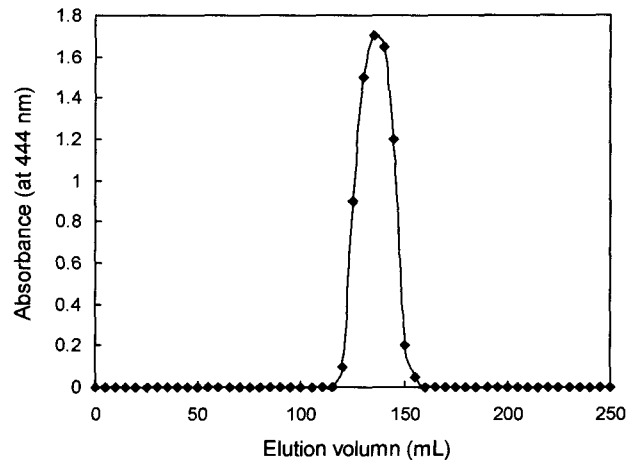


Fig. 2. Elution profiles of fucoxanthin by silica gel column chromatography.

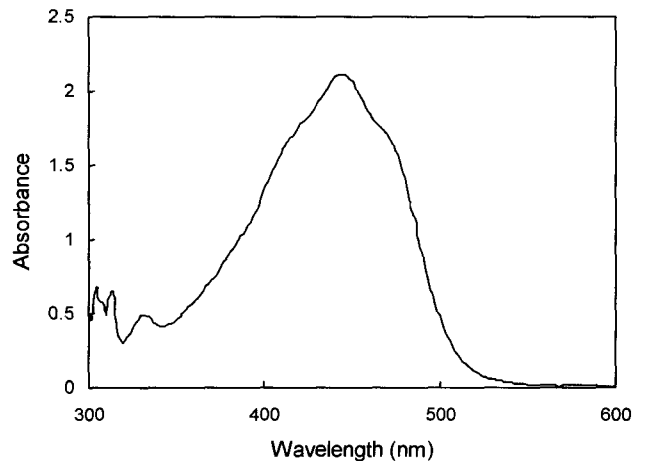


Fig. 3. Visible absorption spectra of fucoxanthin isolated from silica gel column chromatography.

색소는 fucoxanthin인 것으로 판단되었다.

정제 및 HPLC상의 거동

Silica gel column chromatography에서 얻어진 fucoxanthin 색소를 더욱 정제하기 위하여 HPLC를 행하였다. 순상계 column을 사용한 fucoxanthin의 HPLC chromatogram은 Fig. 4에 나타난 것처럼 retention time이 8.1분에서 단일 피크를 나타내었다. HPLC에서 얻어진 단일피크의 획분은 합하여 농축하고 fucoxanthin 자동산화에 이용할 시료로 사용하였다.

HPLC로 정제하여 얻어진 fucoxanthin을 dichloromethane에 용해하고 생체막 구조인 인지질 안에서의 거동을 살펴본 결과는 Fig. 5에 나타났다. 인지질에서의 fucoxanthin은 retention time이 14.6분으로 나타났으며 자동산화 후 생성된 fucoxanthin의 산화물은 retention time이 5.5분부터 8.5분 사이에 5개의 산화물의 피크로 나타났다. 이러한 결과는 Kim 등(19,20)이 lycopene과 phytofluene을 대상으로 한 인지질에서 다양한 산화개열산물이 생성되는 경향과 유사하였으며,

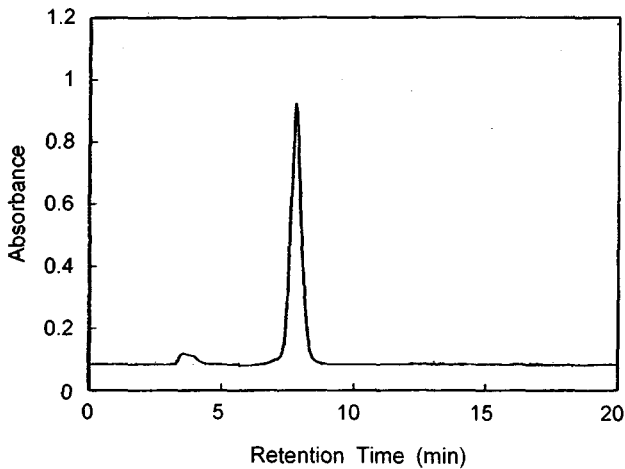


Fig. 4. HPLC chromatogram of fucoxanthin by silica gel column chromatography.

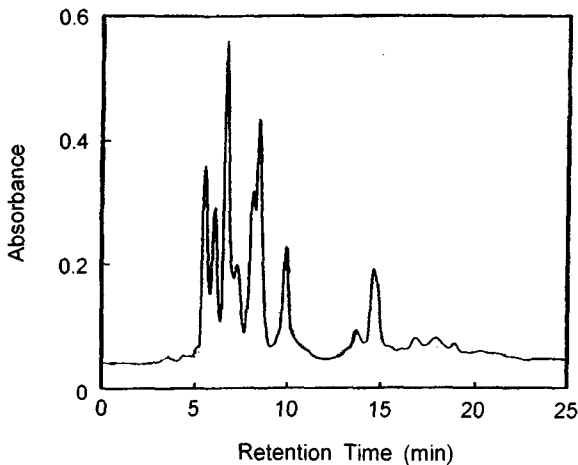


Fig. 5. HPLC chromatogram of cleavage products formed by autoxidation of fucoxanthin.

Fucoxanthin was solubilized at 50 μ M in liposomal suspension of 5 mM dimyristoylphosphatidylcholine and incubated at 37°C for 24 hr.

대부분의 carotenoids가 가지고 있는 이중결합이 개열되면서 새로운 생체기능성 물질을 생성하는 것으로 판단된다.

한편 최근의 연구에서 천연색소 뿐만 아니라 그 대사산물이 산화 스트레스에 의한 다종다양한 질병의 발증의 억제에 큰 관계가 있다는 관점에서 다양한 연구들이 진행되고 있다. 즉 Mordí 등(22)은 benzene에 용해된 β -carotene이 자동산화에 의해 retinal, apocarotenal 등의 산화개열산물이 생성한다고 하였고, canthaxanthine이 세포배양용 배지에서 산화되어 4-oxo-retinoic acid가 생성하며 이 물질이 F9 embryonal carcinoma의 분화 유도활성을 나타냈다는 보고(23), β -carotene이 3-chloroperoxybenzoic acid에서 자동산화에 의해 5,8-endoperoxy-2,3-dihydro- β -apocarotene-13-one을 생성하였으며 이 화합물이 유방암세포의 생육 및 콜레스테롤 합성의 억제효과를 나타냈다고 한다(24). 그리고 Araki 등(25)과 Shidoji와 Muto(26)가 비환식 retinoid가 발암억제 작

용을 한다는 보고는 비환식 retinoid가 retinoid receptor의 ligand로 작용하며, 특히 4,5-didehydrogeranoic geranoic acid, geranyl geranoic acid가 all-trans retinoic acid와 동일한 생물활성을 나타냈다고 한다. 이들의 보고는 산화스트레스를 받은 조직에 있어서 carotenoid가 비효소적인 산화반응에 의해 대사 분해되어 retinoid와 유사한 물질로 변환되며, 그 산화분해물들이 생물활성을 발현할 가능성이 있다는 것을 시사하고 있다. 그리고 Kim(27)은 ζ -carotene의 자동산화에 따른 ζ -carotene 유래의 산화개열산물의 동정연구를 통하여 carotenoids가 생체내에서 분해되어 vitamin A 유사활성 물질이 생성됨을 확인하였으며 이들 활성성분들이 소장내의 효소들과 반응하여 acidic compound를 생성하거나 생체기능을 담당하는 것으로 보고하였다.

본 연구에서의 fucoxanthin은 해조류에 대부분 함유되어 있고 인간이 미역 등을 섭취할 때 생체에 축적되거나 분해되어, 생성된 산화대사산물이 생체에서 기능적 역할을 담당할 수 있는 가능성이 매우 높다. 현재 fucoxanthin이 생체계에서 산화되어 분해산물을 생성하는 경향을 바탕으로 fucoxanthin 대사산물의 구조분석 및 생체기능성 연구가 진행 중에 있다.

요 약

미역의 부위별 fucoxanthin 함량은 미역엽 87.6 mg/100 g, 미역줄기에 62.4 mg/100 g 그리고 미역귀에 127.7 mg/100 g를 나타내어 미역귀에 함유되어 있는 fucoxanthin함량이 미역엽에 비해 1.4배, 미역줄기에 비해 2.0배 더 함유되어 있는 것으로 나타났다. Fucoxanthin은 444 nm에서 최대흡수극대를 나타내는 전형적인 carotenoids의 분광학적 특성을 나타냈다. 미역에 존재하는 fucoxanthin은 용매분획, silica gel column chromatography와 HPLC를 이용하여 분리 정제하고, 얻어진 fucoxanthin을 인공생체막인 인지질에서의 자동산화에 이용하였다. 인지질에서 50 μ M fucoxanthin을 37°C에서 72시간 자동산화시킨 결과, 5개의 산화물이 생성되었다. 이러한 산화물은 *in vitro* 상의 산화적 조건하에서 fucoxanthin 자동산화에 의해 생성된 산화개열산물로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 과기부와 목포시에서 지원하는 지역협력연구사업(해조류 가공과 기능성 물질 개발 연구) 결과의 일부로서 연구비지원에 감사하며, 연구 수행에 많은 도움을 준 한국과학재단지정 지역협력연구센터(RRC)인 목포대학교 식품산업기술연구센터에 감사드립니다.

문 헌

1. Kechrer JP. 1993. Free radical as mediations of tissue injury

- and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* 23: 21-48.
2. Choi HS, Kim SS, Kim JG, Kim WJ. 1992. Effect of temperature on some quality characteristics of aqueous extracts of sea mustard. *Korean J Food Sci Technol* 24: 382-386.
 3. Kim WJ, Choi HS. 1994. Development of combined methods for effective extraction of sea mustard. *Korean J Food Sci Technol* 26: 44-50.
 4. Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. 1998. Effect of low-molecularization on rheological properties of alginate. *J Korean Fish Soc* 31: 82-89.
 5. Koo JG, Jo KS, Do JR, Woo SJ. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. *J Korean Fish Soc* 28: 227-236.
 6. Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, Ito H. 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*). *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 563-567.
 7. Rhee SH. 1972. A study on the calcium and iron content of the *Undaria pinnatifida suringar*. *J Korean Soc Food Nutr* 1: 25-31.
 8. Suzuki T, Nakai K, Yoshie Y, Shirai T, Hirano T. 1993. Effect of sodium alginates rich in guluronic acid and mannuronic acids on cholesterol levels and digestive organs of high-cholesterol-fed rats. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 545-551.
 9. Mascio P, Kaiser S, Sies H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274: 532-538.
 10. Rao AV, Agarwal S. 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases. *Nutr Res* 19: 305-323.
 11. Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer. *J National Cancer Institute* 91: 317-331.
 12. Hu X, White KM, Jacobsen NE, Mangelsdorf DJ, Canfield LM. 1988. Inhibition of growth and cholesterol synthesis in breast cancer cells by oxidation products of β -carotene. *J Nutr Biochem* 9: 567-574.
 13. Araki H, Shidoji Y, Yamada Y, Moriwaki H, Muto Y. 1995. Retinoid agonist activities of synthetic geranyl geranoic acid derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 66-72.
 14. Shidoji Y, Muto Y. 1999. Acyclic retinoids and their cancer preventive action. *Vitamin* 71: 221-234.
 15. Krinsky NI. 1993. Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann New York Acad Sci* 686: 229-234.
 16. Krinsky NI. 1994. Carotenoids and cancer, basic research studies, natural antioxidants in human health and disease. *Ann New York Acad Sci* 239: 1-6.
 17. Gerster H. 1993. Anticarcinogenic effects of common carotenoids. *Int J Vitam Nuri Res* 63: 93-98.
 18. Haugan JA, Aakermann T, Liaaen-Jensen S. 1992. Isolation of fucoxanthin and peridinin. *Methods in Enzymology* 213: 231-245.
 19. Kim SJ, Nara E, Kobayashi H, Terao J, Nagao A. 2001. Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids* 36: 191-199.
 20. Kim SJ. 2000. Autoxidation products of phytofluene in liposome and conversion of phytapentaenal to 4,5-didehydrogeranyl geranoic acid in pig liver homogenate. *J Food Sci Nutr* 5: 234-238.
 21. Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 605-607.
 22. Mordt RC, Walton JC, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Lindsay DA, Moffatt DJ. 1993. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* 49: 911-928.
 23. Nikawa T, Schulz WA, Brink CE, Hanusch M, Saag P, Stahl W, Sies H. 1995. Efficacy of all-trans- β -carotene, canthaxanthine, and all-trans-, 9-cis- and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RAR β -lac-Zrepoter cell line. *Arch Biochem Biophys* 316: 665-672.
 24. Hu X, White KM, Jacobsen NE, Mangelsdorf DJ, Canfield LM. 1988. Inhibition of growth and cholesterol synthesis in breast cancer cells by oxidation products of β -carotene. *J Nutr Biochem* 9: 567-574.
 25. Araki H, Shidoji Y, Yamada Y, Moriwaki H, Muto Y. 1995. Retinoid agonist activities of synthetic geranyl geranoic acid derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 66-72.
 26. Shidoji Y, Muto Y. 1999. Acyclic retinoids and their cancer preventive action. *Vitamin* 71: 221-234.
 27. Kim SJ. 2000. Oxidative cleavage products of ζ -carotene. *Korean J Food Sci Technol* 32: 985-990.

(2004년 2월 23일 접수; 2004년 5월 27일 채택)