

가공방법 및 용매에 따른 미더덕 추출물의 항산화 및 항암효과

김진주 · 김선정 · 김선희 · 박해룡 · 이승철*

경남대학교 식품생명공학부

Antioxidant and Anticancer Activities of Extracts from *Styela clava* According to the Processing Methods and Solvents

Jin-Ju Kim, Sun-Jung Kim, Sun-Hee Kim, Hae-Ryong Park and Seung-Cheol Lee†

Division of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

Styela clava was processed by four different kinds of method including FR (fresh *S. clava*), H1 (heat treated *S. clava* at 110°C for 15 min), H2 (heat treated *S. clava* at 120°C for 5 min), and FD (freeze dried *S. clava*). Each *S. clava* sample was treated with methanol, ethanol, acetone, and water, then antioxidant and anticancer activities of the extracts were evaluated. In extracts from non-dried *S. clava* (FR, H1, and H2), total extract yield decreased with increasing treated temperature. The extraction yield was in the order of ethanol>methanol>water>acetone among treated solvents. In case of dried *S. clava* (FR), the extraction yield was lower than non-dried samples, and was in the order of methanol>ethanol>water>acetone. The radical scavenging activity (RSA) of non-dried *S. clava* (FR, H1, and H2) was in the order of acetone>ethanol>methanol and heat treatment also decreased RSA. RSA of FD was the highest in ethanol extract, while acetone and water extracts did not show RSA. When antioxidant activity was determined by reducing power (RD), methanol extract of FR showed the highest values and heat treatment decreased RD, too. RD of FD was in the order of methanol>ethanol>water>acetone. The acetone extracts from FD showed significant anticancer activity against human colon cancer cell line HT-29. These results indicated that extraction yield and properties of extracts from *S. clava* were dependent on processing temperature, solvent and/or physicochemical state. The appropriate extraction process should provide some valuable bioactive materials from *S. clava*.

Key words: *Styela clava*, antioxidant activity, anticancer, freeze-drying, heat-treatment

서론

지구상에 존재하는 대부분의 생명체는 에너지대사에 산소를 절대적으로 필요하고 있다. 그러나 산소가 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면 생체에 치명적인 영향을 미친다. 즉, 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 유전자 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 산화반응을 유발하여 면역체계를 파괴함으로써 노화 및 각종 질병을 일으키는 것으로 밝혀졌다(1,2).

활성산소는 정상적인 세포 대사과정에서도 일부 생성되고 있으며 체내에서는 각종 항산화효소와 항산화물질로 이를 제어하고 있다(3). 그러나 현대생활에서는 각종 환경요인에 의하여 과량의 활성산소가 생성되어 인체 내의 항산화물질은 부족한 상태이며, 이로 인해 각종 질병과 노화가 유발된다. 항산화물질은 식품산업, 제약산업, 화장품산업 등 다양한 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다(4). 특히 지금까지 알려진 항산화제가 약한 활성, 독성 및 사용상의 한계로 인하여 의약품소재로 사용하는 데에 있어서 많은 문제점을 내포하고 있어(5), 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 천연 항산화제의 개발이 요구된다.

한편, 암은 2003년도 우리나라 전체 사망 원인의 25.9%를 차지하여 사망원인 1위를 차지하고 있어 국민 건강에 매우 위협적이다(6). 암이 발생되어 진행이 계속될 경우 수술, 약물치료 및 방사선치료 등을 통한 집중적인 치료를 해야 하지만 이와 같은 약물치료는 그 독성 등의 후유증을 배제할 수 없으므로 최근 항암 및 암예방이 우수한 새로운 천연물 중에서 안전성이 있는 약물개발이 절실히 요구되고 있다(7,8).

해양생물은 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다. 또한, 육상생물은 이미 많은 연구가 진행되었으나 해양생물은 아직 제한된 연구로 인하여 미지의 천연물질의 개발에 대한 기대가 매우 높고 평가되고 있다(9).

*Corresponding author. E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2684. Fax: 82-55-249-2995

미더덕(*Styela clava*)은 척삭동물문 미색동물아문에 속하는 해양생물로서, 독특한 향과 맛으로 인해 식품에 널리 이용되고 있다. 미더덕은 우리나라 전역에서 발견되고 있으나, 경상남도 마산시에서 우리나라 소비량의 80% 정도를 생산하고 있다. 미더덕에 대한 연구는 스테롤함량(10), 계절에 따른 영양성분 조성의 변화(11) 등 주로 성분에 대한 연구가 대부분이었으며, 기능성 성분으로는 껍질로부터 glycosaminoglycan을 추출한 예(12)가 있었다. 또한, 미더덕 유래 용혈성 항균 펩티드에 대한 보고가 외국에서 연구되어 보고되었으나(13-16), 아직 미더덕의 기능성 소재에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 미더덕 유래 항산화 물질을 탐색하고 그 기능성을 조사하여 미더덕의 소비증진을 통한 어민의 수입 증대뿐만 아니라 신규 소재발굴을 기하고자 하였다.

재료 및 방법

미더덕 및 시약

본 실험에 사용한 미더덕(*Styela clava*)은 경상남도 마산시 진동면 고현마을에서 2004년 10월에 구입하였다. 구입한 미더덕의 이물질을 제거하고 물로 깨끗이 여러 번 씻어 물기를 제거한 후, 분쇄기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 한국)를 이용하여 분쇄하여 사용하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, potassium ferricyanide, ethanol, 염화철은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

가공 처리 및 추출물 제조

신선한 미더덕을 믹서기(Mixer MC-811C, (주)노비타, 한국)로 분쇄한 후, 분쇄물 100 mL에 1 L의 용매(methanol, ethanol, acetone, water)를 각각 가하여 진탕배양기(HB-201s, (주)한백, 한국)에서 25°C, 100 rpm의 조건으로 18시간 추출하여 FR시료라 명명하였다. 한편, 미더덕을 110°C에서 15분간 가열 처리한 후 분쇄하여 같은 방법으로 추출한 시료를 H1, 120°C에서 5분간 가열한 후 분쇄하여 추출한 시료를 H2라 명명하였다. 또한, 신선한 미더덕의 분쇄물을 심온동결기(Upright Deep freezer VX 530, 한국)로 -70°C에서 하룻밤 저장하고, 동결건조기(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, 한국)로 4일 동안 완전히 건조시킨 후, 다시 분쇄기를 이용하여 분말로 만들어서 27 mesh의 체로 걸러 분말의 크기를 일정하게 했다. 분쇄한 미더덕 100 mL로부터 약 9 g의 동결건조 시료를 회수할 수 있었다. 동결건조 시료 9 g에 100 mL 용매를 각각 가하여 진탕배양기에서 위에 서술한 바와 같은 방법으로 추출하여 FD시료라 명명하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 회전진공농축기(Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 37°C에서 농축하였다. 각 농축물을 유리병에 담아

질소치환 후 4°C에서 저장하였고, 최종농도 50 mg/mL로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 분석에 사용하였다.

라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Lee 등(17)의 방법에 준하여 시료 0.1 mL에 4.1×10^{-5} M의 DPPH 용액 0.9 mL를 가한 후 상온에서 10분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

전자공여능 = $(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}) \times 100$ 백분율로 나타내었다.

환원력 측정

환원력은 항산화 물질에 대한 철 이온의 환원력을 측정하였다(18). 즉, 1 mL의 인산염 완충용액(0.2M, pH 6.6)에 1 mL의 미더덕 추출물과 1%(w/v) potassium ferricyanide 용액 1 mL를 가하고 이 혼합물을 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10%(w/v) trichloroacetic acid 용액 1 mL를 넣었다. 반응이 끝난 혼합물을 13,400×g에서 원심분리하여 얻은 상정액 1 mL와 증류수 1 mL를 넣고 0.1% 염화철 용액 0.1 mL를 넣고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포배양

본 실험에서 사용한 암 세포주는 인간 대장암 유래의 세포인 HT-29를 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 RPMI1640 medium(Gibco BRL)을 사용하였으며 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제는 100 units/mL의 penicillin, 100 µg/mL의 streptomycin을 처리하였고 5% CO₂, 37°C의 incubator에서 배양하였다(19). 세포는 PBS(phosphate buffered saline) buffer로 세척한 후 0.25% trypsin 0.02% EDTA(Gibco BRL)를 사용하여 부착된 세포를 분리하였다. 집적된 암세포에 배지를 넣고 암세포가 팔고루 분산되도록 피펫으로 잘 혼합하여 cell culture dish에 10 mL씩 일정량 분할하여 주입하고, 3~4일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

암세포 증식억제 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 사용하여 MTT assay로 행하였다(20). 각 세포주를 1×10^5 cells/well의 농도로 맞추고 96 well에 각각 100 µL씩 첨가하여 24시간 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹여진 미더덕 추출물 시료를 각각 5, 10, 50, 100 및 500 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT용액을 10 µL씩 첨가하여 4시간 동안 다시 배양시킨 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO를 100 µL 첨가하여 천천히 녹인 후 ELISA reader(BioRad, Microplate, Model 680, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군 세포수를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 그 평균값은 SAS software를 사용하여 General Linear Model의 방법에 따라 처리하였다(21). 모든 처리 값의 차이는 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)로 비교하여 분석되었다.

결과 및 고찰

추출수율

가공방법과 추출용매에 따른 미더덕의 추출수율을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 미더덕은 연간 많은 양이 생산되어 소비되고 있지만 기존의 유통 방식으로는 4°C에서 3일간의 유효기간을 가지고 있어 장기유통이나 저장과정이 소요될 때에는 미생물에 의한 품질저하와 위생적인 문제가 발생한다. 장기간 유통 가능한 미더덕 제품을 개발하기 위해 레토르트를 이용하여 살균조건을 검토하였고, 110°C에서 15분간 또는 120°C에서 5분간 가열하는 조건이 적합함이 보고되었다(22). 이와 같이 열처리를 한 시료인 H1, H2는 신선한 미더덕의 추출물(FR)에 비하여 열처리 온도가 높을수록 전체적인 수율은 감소하였으나, 용매에 따라 회수되는 비율은 비슷한 경향을 나타내었으며 에탄올을 이용하였을 때 가장 높은 수율을 보였다. 가장 많이 추출된 조건은 신선한 미더덕의 분쇄물 100 mL로부터 에탄올을 이용하여 추출하였을 때 1.86 g의 추출물이 얻어진 경우이었다.

한편, 100 mL의 신선한 미더덕 분쇄물을 동결건조하면 9.0 g의 건조분말을 회수할 수 있었는데, 동결건조한 미더덕 분말 9.0 g에 100 mL의 용매를 첨가하여 추출물을 제조한 경우(FD)에는 수분을 함유하고 있는 미더덕 분쇄물의 추출물(FR, H1, H2)의 경우보다 전체적인 수율이 낮고 경향이 달랐다. 즉, 메탄올을 이용한 경우에는 1.22 g이 추출되어 추출량은 FR, H1, H2에 비해 줄었지만 전체 추출물에서 차지하는 비율은 32.8%로 증가하였고, 물로 추출한 경우에는 1.12 g이 추출되어 절대량 및 상대량도 매우 증가하였다. 아

세톤에 의해 추출되는 양은 매우 줄어 0.21 g에 불과하였고 5.6%에 해당하였다. 이러한 결과는 주름 미더덕(일명 오만둥이)으로부터 같은 방법으로 추출물을 제조할 때와 유사한 경향을 나타내었으며(23), 이는 미더덕류에 함유된 수분의 유무에 기인한다.

라디칼 소거능

유리 라디칼은 생물학적 손상의 주요요인으로 잘 알려져 있는데, DPPH는 천연 항산화제의 유리 라디칼 소거능을 평가하는데 일반적으로 사용된다(24). 보라빛을 나타내는 DPPH는 항산화제와의 반응에 의해 안정한 화합물로 변하면 노란색으로 변한다. 이러한 반응의 정도는 항산화제의 수소 공여능에 의존한다(25).

가공방법과 추출용매에 따른 미더덕 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Fig. 1에 나타내었다. 미더덕 분쇄물의 추출물(FR, H1, H2)의 경우 아세톤>에탄올>메탄올 순으로 라디칼 소거능을 나타내었고, 물 추출물은 매우 낮은 활성을 보

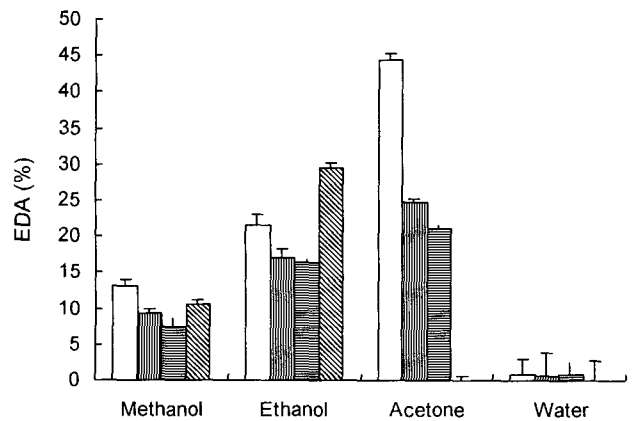


Fig. 1. Radical scavenging activity of extracts from *Styela clava*.

Each extract was prepared from fresh *S. clava* (□), heat treated *S. clava* at 110°C for 15 min (▨), heat treated *S. clava* at 120°C for 5 min (▩), and freeze dried *S. clava* (▧).

Values represent mean \pm SE of triplicate determinations.

Table 1. Extraction yield from *Styela clava* depending on processing methods and solvents (g)

	FR ¹⁾		H1 ²⁾		H2 ³⁾		FD ⁴⁾	
	Weight ⁵⁾	% ⁶⁾	Weight ⁵⁾	%	Weight ⁵⁾	%	Weight ⁷⁾	%
Methanol	1.65	25.7	1.51	25.2	1.17	23.8	1.22	32.8
Ethanol	1.86	29.0	1.75	29.2	1.60	32.5	1.17	31.5
Acetone	1.28	20.0	1.10	18.3	1.08	22.0	0.21	5.6
Water	1.62	25.3	1.64	27.3	1.07	21.7	1.12	30.1
Total	6.41	100	6.00	100	4.92	100	3.72	100

¹⁾FR: extracts from fresh *S. clava*.

²⁾H1: extracts from *S. clava* after heat treatment at 110°C for 15 min.

³⁾H2: extracts from *S. clava* after heat treatment at 120°C for 5 min.

⁴⁾FD: extracts from freeze dried *S. clava*.

⁵⁾Weight in FR, H1, H2 column means weight (g) of extract from 100 g of ground *S. clava*.

⁶⁾% means percent of total extracts.

⁷⁾Weight in FD column means weight (g) of extract from 9.0 g of freeze-dried materials, which were obtained from 100 mL of *S. clava*.

었다. 이들 추출물은 물을 제외한 모든 추출용매에서 FR>H1>H2의 순서로 라디칼 소거능을 보였는데, 이는 고온의 열처리가 미더덕의 항산화력을 감소시키는 것을 의미한다. 가장 높은 라디칼 소거능은 FR의 아세톤 추출물에서 44.45%로 측정되었다.

그러나 동결건조한 미더덕(FD)은 에탄올 추출물이 가장 높은 라디칼 소거능을 보였고(29.56%); 아세톤과 물 추출물에서는 활성을 나타내지 않았다. 주름 미더덕의 경우에는 (23) 동결건조물의 에탄올 추출물에서는 활성을 나타내지 않았으나 물 추출물에서는 활성을 보인 것으로 보아 구성분에서 약간의 차이가 있음을 시사한다.

이상의 결과는 열처리 온도와 수분 유무가 미더덕 추출물의 항산화력에 크게 영향을 미침을 의미한다. 미더덕은 척삭동물문의 미색동물아문의 우렁쟁이(멍게)과에 속하는 해양생물로, 우렁쟁이와 유사한 특성을 지니고 있다. 우렁쟁이에는 다양한 carotenoid 색소가 존재하며(26-28), 특히 껍질 부분에 alloxanthin을 비롯한 xanthin계 carotenoid가 많이 함유되어 있다(29). 이러한 carotenoid는 강한 항산화활성을 나타내는데(30), 우렁쟁이와 유사하게 미더덕의 경우에도 carotenoid가 항산화활성을 보인 것으로 사료된다.

환원력측정

다양한 미더덕 추출물의 환원력을 Fig. 2에 나타내었다. 어떤 물질의 환원력은 그 물질의 항산화능력의 중요한 지표가 된다(31). 신선 미더덕(FR)의 메탄올 추출물이 가장 높은 활성을 보였고, 열처리 온도가 높을수록 모든 용매에서 환원력은 감소하였다. 동결건조 미더덕(FD)의 경우에는 메탄올 > 에탄올 > 물 > 아세톤의 순서로 환원력이 측정되었다. 이러한 결과는 Fig. 1의 DPPH 라디칼 소거능과는 정확히 일치하지는 않는데, 이는 항산화물질의 작용이 여러 기작 즉, 연쇄반응 개시의 방해, 전이 금속물의 결합, 과산화물의 분해, 연속적 수소제거의 방해, 라디칼 소거 등과 관련이 있으므로

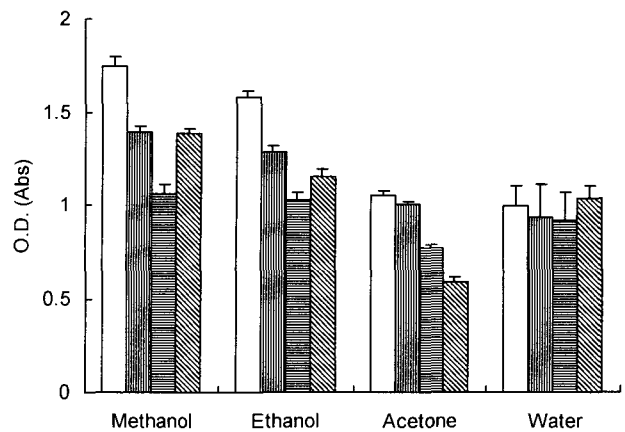


Fig. 2. Reducing power of extracts from *Styela clava*. Each extract was prepared from fresh *S. clava* (□), heat treated *S. clava* at 110°C for 15 min (▨), heat treated *S. clava* at 120°C for 5 min (▩), and freeze dried *S. clava* (▧). Values represent means ± SE of triplicate determinations.

측정대상과 방법에 따라 차이가 나기 때문이다(32).

암세포 증식억제에 미치는 미더덕 추출물의 영향

인간 유래의 대장암 세포주 HT-29에 대한 미더덕 추출물의 암세포 증식억제 효과에 대한 실험결과는 Fig. 3과 같다. 각 용매에 대한 추출물의 항암효과를 조사하기 위하여 MTT reduction assay법(20)을 이용하였으며 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 각 추출물의 암세포 증식억제효과를 확인하였다. 신선 미더덕 추출물의 경우에는 물 추출물을 포함한 전 추출물에서 항암활성을 보이지 않았으며 가장 농도가 높은 500 µg/mL에서 약간의 항암활성을 보였다(Fig. 3A). 그러나 동결건조 미더덕 분말로부터 추출한 경우에는 acetone 추출물이 농도 의존적으로 암세포 증식억제를 나타내지는 않았지만, 추출물의 농도가 500 µg/mL에서 약 40% 이하의 암세포 증식억제활성을 보였다(Fig. 3B). 그러나 활성을 나타내는 농도는 현저히 높음에 이는 현재 추출물에

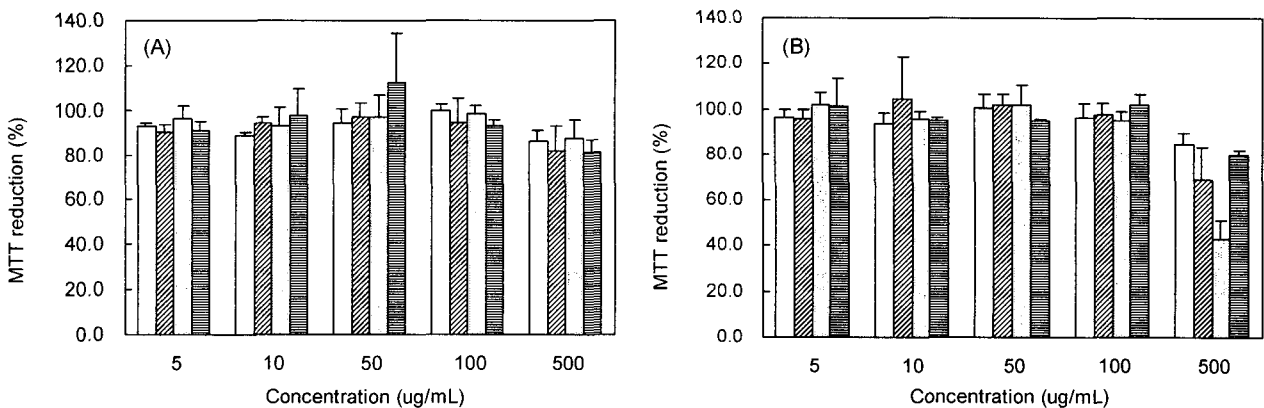


Fig. 3. Anticancer activity of extracts from *Styela clava*. Each extract was prepared with MeOH (□), EtOH (▨), acetone (▩), and distilled water (▧) from fresh *S. clava* (A) and freeze dried *S. clava* (B).

불순물이 많이 함유되어 있음을 의미하며 정제수율을 높이 면 상대적 활성이 증가하리라 예상된다. 그 이외의 동결건조 미더덕 추출물은 신선 미더덕 추출물의 경우와 마찬가지로 거의 활성을 보이지 않았다.

이상의 결과로 미더덕에 항산화력과 항암력을 가지는 성분이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 지금까지는 한약재를 비롯한 농산물 유래의 추출물이 항암효과를 보이는 연구(33,34)가 보고된바가 있으나 해양생물 유래의 추출물에서 항암효과를 보이는 결과에 대해서 구체적으로 보고된바가 많이 없는 실정이다. 따라서 이번 연구결과는 생리활성물질 탐색함에 있어서 추출방법의 중요성과 해양생물이 중요한 천연자원이 될 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

신선한 미더덕 분쇄물로부터 열처리하지 않은 시료(FR), 110°C에서 15분간 열처리한 시료(H1), 120°C에서 5분간 열처리한 시료(H2), 동결건조한 시료(FD)를 제조하고, 이들로부터 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물 추출물을 제조하여 추출수율, 항산화활성, 항암활성을 조사하였다. 수분이 함유된 시료인 FR, H1, H2의 경우 열처리 온도가 높을수록 전체적인 추출수율이 감소하였으나, 용매에 따라 회수되는 비율은 비슷한 경향을 나타내었으며 에탄올을 이용하였을 때 가장 높은 수율을 보였다. 건조시료인 FD의 경우 FR, H1, H2의 경우보다 전체적인 수율이 낮고 경향이 달랐는데, 아세톤에 의해 추출되는 양이 매우 줄었으며 물을 이용한 경우 매우 증가하였다. 미더덕 추출물의 항산화력은 DPPH 라디칼 소거능과 환원력으로 측정하였다. FR, H1, H2는 아세톤>에탄올>메탄올 순으로 라디칼 소거능을 나타내었고, 모든 추출용매에서 FR>H1>H2의 순서로 라디칼 소거능을 보였다. 한편 FD는 에탄올 추출물이 가장 높은 라디칼 소거능을 보였고, 아세톤과 물 추출물에서는 활성을 나타내지 않았다. 환원력의 경우, FR의 메탄올 추출물이 가장 높은 활성을 보였고, 열처리 온도가 높을수록 모든 용매에서 환원력은 감소하였다. FD의 경우에는 메탄올>에탄올>물>아세톤의 순서로 환원력이 측정되었다. 미더덕에 열처리를 한 경우, 열처리 온도가 상승할수록, 라디칼 소거능 및 환원력이 모두 감소하였다. 대장암 세포주 HT-29에 대한 미더덕 추출물의 암세포 증식억제효과는 동결건조 미더덕의 아세톤 추출물이 500 µg/mL의 농도에서 약 42%의 높은 활성을 보였다. 이상의 실험 결과로 미더덕에 항산화력과 항암력을 가지는 성분이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2004학년도 경상남도 마산시의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Blake D, Winyard PG. 1995. *Immunopharmacology of Free Radical Species*. Academic Prss, San Diego.
2. Lopaczynski W, Zeissel SH. 2001. Antioxidant, programmed cell death, and cancer. *Nutr Res* 21: 295-307.
3. Cook NC, Samman S. 1996. Flavonoids chemistry, mechanism, cardioprotective effects and dietary source. *Nutr Biochem* 7: 66-76.
4. Namiki M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 273-300.
5. Lindenschmidt RC, Trika AF, Guard ME, Witschi HP. 1986. The effect of dietary butylated hydroxy toluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicol* 38: 151-160.
6. National Statistical Office. 2004. Annual Report on the Cause of Death Statistics. Seoul, Korea.
7. Kang TB, Liang NC. 1997. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochem Pharm* 54: 1013-1018.
8. Park KY, Moon SH, Rhee SH, Baek KY, Lim SY. 1995. Effect of tannin from persimmon leaves on the growth inhibition and the synthesis of mRNA of type IV collagen in AZ-521 human gastric cancer cells. *Environ Mut Carcino* 15: 32-37.
9. Park JC. 1996. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Kor J Pharmacogen* 27: 117-122.
10. Jo YG. 1978. The sterol composition of *Styela clava*. *Kor Fish Soc* 11: 97-101.
11. Lee KH. 1995. Seasonal variations of nutrients in warty sea squirt (*Styela clava*). *Food Sci Nutr* 24: 268-273.
12. Ahn SH. 2003. Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Biotechnol Bioproc Eng* 18: 180-185.
13. Lehrer RI. 2001. Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Adv Exp Med Biol* 484: 71-76.
14. Menzel LP, Lee IH, Sjostrand B, Lehrer RI. 2002. Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Dev Comp Immunol* 26: 505-515.
15. Lee IH, Zhao C, Nguyen T, Menzel L, Waring AJ, Sherman MA, Lehrer RI. 2001. Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J Pept Res* 58: 445-456.
16. Taylor SW, Craig AG, Fischer WH, Park M, Lehrer RI. 2000. Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *J Biol Chem* 275: 38417-38426.
17. Lee SC, Kim JH, Jeong SM, Kim DR, Ha JU, Nam KC, Ahn DU. 2003. Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. *J Agric Food Chem* 51: 4400-4403.
18. 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.
19. Goodman GY, Yen YP, Cox TC, Crowlly J. 1987. Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res* 47: 2295-2311.
20. Fish B. 1984. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer Res* 54: 609-615.
21. SAS Institute. 1995. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
22. Rim AR, Jo SC, Jung ES, Kim SH, Lee SC. 2005. Study of heating conditions for long shelf life of *Styela clava*. *J Basic Sci* 21: 47-54.
23. Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005. Anti-

- oxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
24. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharm* 56: 213-222.
 25. Bondent V, Brand-Williams W, Bereset C. 1997. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Lebensm Wiss Technol* 30: 609-615.
 26. Sato A, Shindo T, Kasanuki N, Hasegawa K. 1989. Antioxidant metabolites from the tunicate *Amaroucium multipliatum*. *J Nat Prod* 52: 975-981.
 27. Matsuno T, Ookubo M, Komori T. 1985. Carotenoids of tunicates. III. The structural elucidation of two new marine carotenoids, amarouciaxanthin A and B. *J Nat Prod* 48: 606-613.
 28. Cotellet N, Moreau S, Bernier JL, Catteau JP, Henichart JP. 1991. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Rad Biol Med* 11: 63-68.
 29. Choi BD, Kang SJ, Choi YJ, Youm MG, Lee KH. 1994. Utilization of ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. 3. Carotenoid compositions of ascidian tunic. *Bull Korean Fish Soc* 27: 344-350.
 30. El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 430: 37-48.
 31. Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem* 43: 1813-1819.
 32. Diplock AT. 1997. Will the good fairies please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Rad Res* 27: 511-532.
 33. Jung BM, Lim SS, Park YJ, Bae SJ. 2005. Inhibitory effects on cell survival and quinone reductase induced activity of *Aster yomena* fractions on human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 8-12.
 34. Choe WK, Park JH, Kim SH, Lee DY, Lee YC. 1999. Anti-tumor effects of green tea catechin on different cancer cells. *Korean J Nutr* 32: 838-843.

(2005년 11월 28일 접수; 2006년 3월 13일 채택)