

Astaxanthin과 Astaxanthin-Cyclodextrin 포접화합물의 생리활성

김소영^{1,2} · 조은아¹ · 유귀재¹ · 유지민¹ · 손석민¹ · 인만진³ · 김동청³ · 채희정^{1,2*}

¹호서대학교 식품생물공학과 및 기초과학연구소, ²내추럴초이스(주), ³청운대학교 식품영양학과

Physiological Activity of Astaxanthin and its Inclusion Complex with Cyclodextrin

Soyoung Kim^{1,2}, Eunah Cho¹, Guijae Yoo¹, Jimin Yoo¹, Seok Min Son¹, Man-Jin In³,
Dong Chung Kim³, and Hee Jeong Chae^{1,2*}

¹Department of Food and Biotechnology, Institute of Basic Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²Natural Choice Co., Ltd, Asan 336-795, Korea

³Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

Abstract *In vitro* biological activities such as antioxidant, whitening, anti-hangover and anticancer activities were evaluated. The antioxidant activities of astaxanthin and *H. pluvialis* extract were significantly higher than that of α -tocopherol when the antioxidant activities were determined as xanthine oxidase inhibition, hydroxyl radical scavenging and DPPH radical scavenging. The whitening effect of *H. pluvialis* extract was about two times as kojic acid. *H. pluvialis* extract indicated an anticancer activity on a cervical cancer cell line. Astaxanthin showed anti-hangover effect of 1.5 times as jiguja extract. The anti-hangover effect of the inclusion complex (As- β -CD) was about 1.2 times of jiguja extract. And, the inclusion complex of *Haematococcus pluvialis* (*H.p.*- β -CD) showed almost the same whitening effect as kojic acid.

Keywords: Astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, Inclusion complex, biological activity

서 론

아스타잔틴 (astaxanthin)은 인체내에서 vitamin A의 전구체 역할을 하며, 다른 카로티노이드보다 최소 10배, 비타민 E (vitamin E)인 알파-토코페롤 (α -tocopherol)보다 500배 이상의 항산화 활성을 가지고 있는 물질로 알려져 있다 [1-4]. 아스타잔틴의 강력한 항산화활성은 구조의 C-4, C-4'에 위치한 oxo-group 때문이라고 보고되어 있고 [5], 아스타잔틴의 항산화 기작은 일중항 산소 (singlet oxygen)를 제거하거나 [6] 자유라디칼 소거능 [7,8], 과산화물 연쇄반응 (peroxide chain reaction)을 정지시키는 것으로 알려져 있다 [9,10]. 아스타잔틴의 항산화 작용은 일중항 산소의 제거에 의해

항암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그 예로 아스타잔틴의 활성산소 (oxygen radical) 제거에 의한 개시 (cancer initiation)와 진행 (propagation)의 과정을 감소시켜 난소암, 간암에 대한 예방효과 등이 보고된 바 있다 [11-13]. 이 외에도 아스타잔틴의 항암효과에 대한 많은 연구결과가 보고되었다 [14-18]. 또한 아스타잔틴은 면역기능에 활성이 있는 것으로 알려져 있고 [2,19-23], 심장질환에 대한 치료효과도 보고되었다 [24,25]. 이 외에도 항염증 효과 [26], 자외선 차단 효과 [27], 눈 기능과 관련된 효과 [28-31], 간 기능에 대한 영향 [32]이 보고된 바 있다. 또한, 아스타잔틴의 미백활성이 미백제로 알려진 kojic acid와 비슷한 활성을 지니는 것으로 보고된 바 있다 [33].

그러나 현재 아스타잔틴 (astaxanthin)은 다양한 생리활성에도 불구하고 산업적으로 응용이 미비한 실정이다. 이러한 이유는 아스타잔틴의 구조에 기인하는 결과이다. 아스타잔틴은 구조적으로 이중결합을 가진 불포화화합물로 제조

*Corresponding author

Tel: +82-41-540-5642, Fax: +82-41-532-5640

e-mail: hjchae@hoseo.edu

나 저장시 열과 산화(빛)에 의해 쉽게 파괴되어 활성이 감소하며, 또한 지용성 물질로서 단일 또는 단백질과 에스터(ester) 결합 구조를 가지고 있어 물에서 용해가 잘 되지 않는다 [34]. 이러한 아스타잔틴의 불안정성과 수불용성이 응용에 제한으로 작용한다.

현재 국내외적으로 아스타잔틴의 안정성과 용해도 개선을 위한 제형화 연구는 미비한 실정이다. 국내에서는 아스타잔틴을 수용화하기 위한 방법으로 키토산 등 수용성 고분자를 이용한 연구를 진행하였으나, 현재 실용화되지 않은 상태이고, 그 안정성이나 효능 또한 입증되지 않았다 [35]. 또한 안정성 향상의 측면에서 아스타잔틴 유액제조에 의한 안정성 향상이 보고된 바 있고 [36], chitosan matrix를 이용하여 아스타잔틴을 캡슐화하여 온도에 대한 저장성 개선 [37], 키토산을 이용하여 헤마토코커스로부터 추출한 아스타잔틴을 캡슐화하여 산화안정성 개선과 저장에 따른 항산화활성이 보고된 바 있다 [38]. 현재까지 국내외적으로 아스타잔틴 제형화 연구는 초기 상태이고 안정성과 용해도를 동시에 높일 수 있는 기술은 미비한 상태라 할 수 있겠다.

본 연구팀에서는 지용성 물질의 안정화와 용해도 향상을 위해 널리 사용되는 수종의 사이클로덱스트린 (β -cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin, hydroxypropyl- γ -cyclodextrin)을 이용한 포접화합물을 제조하였고 안정성과 용해도를 향상시킨 아스타잔틴 제형을 얻을 수 있었다. β -CD를 이용하여 포접시켰을 경우 자외선, 산화, 산성조건 및 열처리에 대한 안정성이 크게 향상되었고, 물에 대한 용해도는 아스타잔틴에 비해 pH 6.5에서 110배, 25°C에서 13배 증가된 것을 확인하였다 [39].

본 연구에서는 아스타잔틴의 항산화 기작을 확인하고자 다양한 항산화 활성의 측정법을 통해 항산화 활성을 확인하였다. 또한 유방암, 폐암 및 자궁경부암에 대한 항암효과를 측정하였고, 미백기능과 함께 숙취해소에 대한 효과를 검토하였다. 특히 cyclodextrin과의 포접화합물을 조제하였을 경우에도 유리형 아스타잔틴과 비슷한 생리활성을 나타내는지 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Astaxanthin은 Sigma사 (MO, USA)의 제품으로서 순도 92% 이상의 것을 사용하였고, *Haematococcus pluvialis* cracked cell은 순도 1.5%의 Parry Nutraceutical사 (India)로부터 구입하였고, 포접화합물의 제조에 사용된 베타-사이클로덱스트린 (β -cyclodextrin)은 Wako사 (Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. Xanthine과 xanthine oxidase, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), mushroom tyrosinase (25,000 U/mg), kojic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2-deoxyribose, trichloroacetic acid (TCA), bovine

serum albumin (BSA), alcohol dehydrogenase (ADH)는 Sigma사 (MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였고, 4, 6-dihydroxy-2-mercapto-pyrimidine (TBA)은 Alfa Aesar사 (MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA)는 Across Organics사 (NJ, USA)로부터 β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD)는 Fluka사 (Steinheim, Germany)로부터 구입하였다. 항암활성에 사용한 cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo Molecular Technology사 (MD, USA) 제품을 사용하였다. 항암활성을 위한 MCF-7 세포주 (유방암), HeLa 세포주 (자궁경부암)는 한국세포주은행 (한국)으로부터 분양받았다.

헤마토코커스로부터 아스타잔틴의 추출조건

인산완충용액 (pH 5-7)에 헤마토코커스 분말을 0.5% (w/v)의 비율로 현탁시킨 후, 40°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 원심분리로 침전물을 회수하여 아세톤을 0.5% (w/v)의 농도로 첨가한 후 초음파처리 (75 min, 40 kHz; Power sonic 510, Hwashin, Korea)하여 아스타잔틴을 추출하였다.

포접화합물의 제조

사이클로덱스트린을 증류수에 0.1 g/mL의 농도로 50°C에서 가온하면서 용해하였다. 아스타잔틴은 500 μ g/mL의 농도로 염화메틸렌과 아세톤 (3 : 1, v/v) 혼합용매에 용해하였다. 사이클로덱스트린 용액과 아스타잔틴 용액을 1 : 1 (v/v)의 비율로 첨가한 후, 50°C에서 7시간 교반하였다. 교반이 끝난 다음 냉각시킨 후, 4°C에서 24시간동안 보관하였고, 증류수와 에탄올로 각각 3회 세척하여 동결건조하여 복합체를 제조하였다.

항산화 활성

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 An 등 (2006)의 방법 [40]에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 mL과 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.5) 0.6 mL을 첨가하고, xanthine (2 mM)을 녹인 기질액 0.2 mL과 xanthine oxidase (0.2 U/mL) 0.1 mL을 가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 1 N HCl 1 mL을 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 요산 (uric acid)의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 식 (1)과 같이 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 uric acid 생산량}}{\text{무첨가구의 uric acid 생산량}}\right) \times 100 \quad (1)$$

DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Heo 등 (2006)의 방법 [41]에 따라 메탄올에 0.4 mM의 농도로 용해한 DPPH 용액 160 μ L와 시료 40 μ L를 첨가하여 암소에서 30분간 방치한 다음 microplate reader (VERSAmax, Molecular Device, CA, USA)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Hydroxyl radical 소거능 측정

Hydroxyl radical 소거능은 Kang 등 (2001)의 방법 [42]에 의해 측정하였다. 50 mM FeSO₄·7H₂O 20 μ L와 50 mM의 EDTA 20 μ L를 각각 넣고, 50 mM 2-deoxyribose 40 μ L와 시료 40 μ L를 첨가하였다. 여기에 100 mM 인산완충용액 (pH 7.4) 240 μ L와 50 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 2.8% TCA 200 μ L와 50 mM NaOH에 용해한 1% TBA 200 μ L를 첨가하여 100°C 15분 동안 가열시키고, 얼음 속에서 급속히 냉각하여 530 nm에서 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 측정하였다. Hydroxyl radical 소거능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

미백활성 (tyrosinase inhibition assay)

Tyrosinase 저해활성 측정은 Jeong 등 (2004)의 방법 [43]에 따라 측정하였다. 반응구는 0.5 M 인산완충용액 (pH 6.5) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 dopachrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

항암활성

10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 각각 배양된 유방암 세포주 (MCF-7)와 자궁암 세포주 (HeLa)를 1×10^4 cell/mL의 농도가 되도록 96 well plate에 각각 180 μ L씩 넣고, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 측정하고자 하는 시료를 phosphate buffer saline (PBS)에 녹인 후 농도별로 20 μ L씩 각 well에 첨가하여 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 새로운 배지 190 μ L와 10 μ L의 CCK-8 용액을 각 well에 가하였다. CO₂ 배양기에서 5%의 CO₂농도하에 4시간 배양 후, microplate reader (VERSAmax, Molecular Device, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 세포에 대한 증식저해율 (inhibition rate, %)로 나타냈으며, 식 (2)와 같이 산출하였다 [44].

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

여기서, A_{sample} : 시료 첨가 well의 흡광도 (570 nm)

A_{blank} : PBS 완충용액 첨가 well의 흡광도 (570 nm)

숙취해소 활성 (alcohol dehydrogenase activity)

숙취해소활성은 Jeong 등 (2004)의 방법 [43]에 따라 기질인 ethanol이 조효소 NAD의 존재 하에서 대사되면서 생성되는 NADH 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 alcohol dehydrogenase (ADH) 활성으로서 측정하였다. 우선 50 mM 인산완충용액 (pH 8.8) 1.3 mL에 15 mM β -NAD를 1.5 mL씩 혼합한 후 95% 에탄올 0.1 mL과 시료를 농도별로 0.1 mL 첨가한 후 25°C로 예열된 항온수조에 넣어 온도를 유지시켜 주었다. 이 반응액에 0.1% bovine serum albumin (BSA, pH 7.5)에 녹인 alcohol dehydrogenase 용액 (ADH, 0.75 unit/mL) 0.1 mL를 신속하게 혼합한 다음 분광광도계로 340 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다. 대조군에는 ADH 대신 0.1% BSA를 첨가하여 흡광도를 측정하였다. 시료의 ADH 활성은 대조군에 대한 상대활성 (%)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

항산화 활성

Shimidzu 등 (1996)은 아스타잔틴이 토코페롤보다 500배 정도 항산화활성이 높음을 보고하였고 [1-4], 아스타잔틴은 다른 카로티노이드보다 최소 10배, vitamin E인 알파-토코페롤보다 500배 이상의 항산화 활성을 가지고 있는데 이것은 C-4, C-4'에 위치한 oxo-group 때문이라고 보고되어 있다 [5]. 아스타잔틴의 항산화 기작은 일중항 산소 (singlet oxygen)를 제거하거나 자유라디칼 소거능이 높고 특히 과산화물 연쇄반응 (peroxide chain reaction)을 정지시켜 지질의 산화를 방지하는 것으로 알려져 있다 [45-48]. 본 연구에서는 아스타잔틴의 항산화능을 확인하기 위해 몇 종류의 항산화 활성을 검토하였다.

항산화 측정 시료로는 합성 아스타잔틴 (astaxanthin)과 헤마토크스 추출물 (*H. pluvialis* extract) 및 이 두 물질을 베타-사이클로덱스트린으로 포접시킨 포접화합물 (As- β -CD와 *H.p.*- β -CD)을 사용하였고, 대조군으로 지용성 항산화제인 알파-토코페롤을 사용하였다. 활성 분석시 포접화합물의 농도는 포접된 아스타잔틴의 농도로 환산하여 첨가하였고, 포접화합물의 특성상 짧은 시간동안의 *in vitro* 실험보다는 상대적으로 오랜 시간동안 반응이 이루어지는 *in vitro* 실험에서 안정화 효과가 나타날 것으로 판단되어 항산화 측정법 중 장시간 반응시킬 수 있는 조건에서 활성 분석 실험을 시

행하였다. 먼저 아스타잔틴의 라디칼 소거능을 확인하였고, 검정방법으로 DPPH 라디칼 소거능, hydroxyl 라디칼 소거능 및 xanthine oxidase 저해활성 등을 측정하였다.

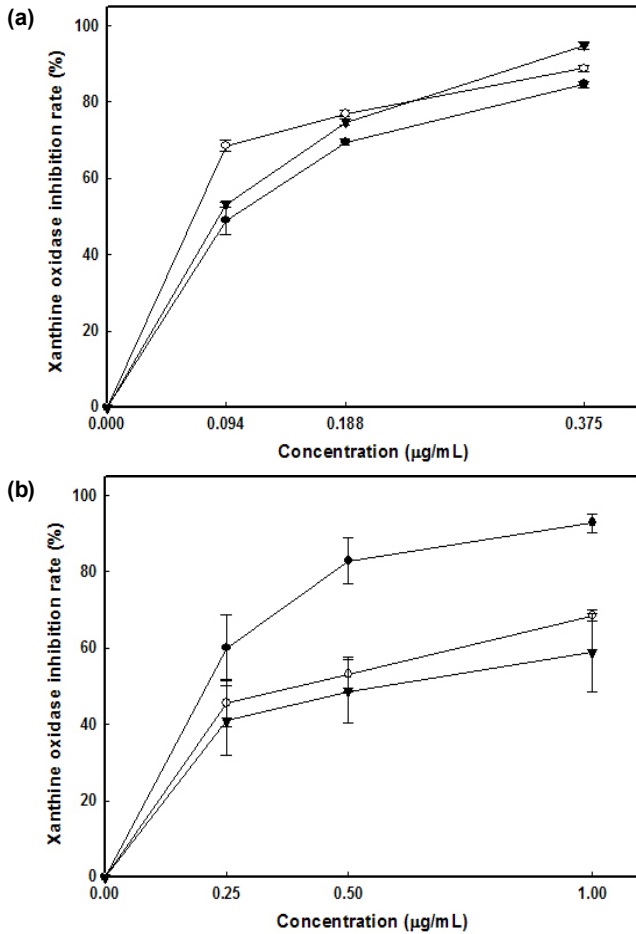


Fig. 1. Inhibition rate of astaxanthin, *H. pluvialis* extract (a) and inclusion complexes (b) on xanthine oxidase. (a) : ●, α-tocopherol; ○, astaxanthin; ▼, *H. pluvialis* extract, (b) : ●, α-tocopherol; ○, As-β-CD; ▼, *H.p*-β-CD.

Xanthine oxidase는 생체 내에서 퓨린 (purine) 대사에 관여하는 효소로 xanthine과 반응하면 심한 통증을 유발하는 요산염 (urate)을 형성하게 된다. Xanthine oxidase와 xanthine 기질과의 반응은 일반적인 라디칼 형성 반응으로 알려져 있다 [42]. Xanthine oxidase 저해활성은 효소 반응액 중에 생성된 요산 (uric acid)의 양을 흡광도로 측정하여 나타낸다. Fig. 1(a)에서 보는 바와 같이 헤마토코커스 추출물은 고형분 (dry matter) 기준으로 0.375 µg/mL 농도에서 90% 이상 xanthine oxidase를 저해하였고, 같은 농도에서 대조군으로 사용된 알파-토코페롤보다도 높은 활성을 나타냈다. 이것은 An 등 (2006) [40]이 보고한 연구결과 (1000 µg/mL에서 40% 저해)와 비교하면 매우 높은 활성이었다 (Fig. 1). Xanthine oxidase 저해활성은 아스타잔틴의 항산화 활성으

로 기준에 보고된 것은 아니지만, xanthine oxidase와 xanthine의 반응에서 일어나는 라디칼 형성을 저해하는 원리로 아스타잔틴의 라디칼 소거능을 확인할 수 있었다. 포접화합물은 포접전의 약 50% 수준의 활성을 나타내는 것으로 나타났고, 1 µg/mL의 농도에서 포접화합물 As-β-CD와 *H.p*-β-CD는 각각 70%와 50% 정도의 저해활성을 보였다 (Fig. 1(b)).

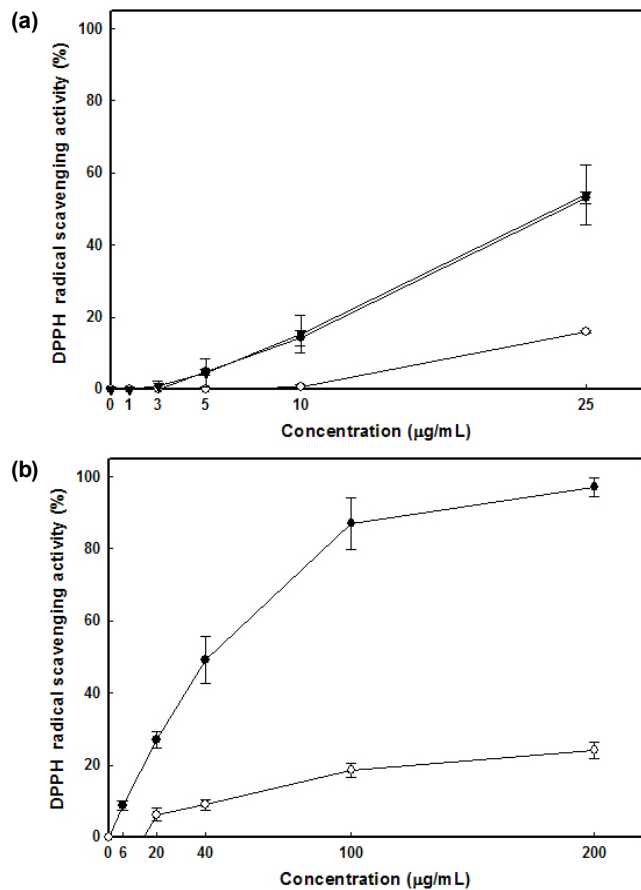


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activities of astaxanthin, *H. pluvialis* extract (a) and inclusion complexes (b). (a) : ●, α-tocopherol; ○, astaxanthin; ▼, *H. pluvialis* extract, (b) : ●, α-tocopherol; ○, As-β-CD.

또한, 가장 보편적으로 사용되고 있는 항산화능의 검정 방법인 DPPH 자유라디칼 소거능을 조사하였다. DPPH는 분자내 라디칼을 함유하고 있으며 토코페롤, ascorbic acid, polyhydroxy aromatic compounds, aromatic amine에 의해 환원되면서 라디칼이 소거되어 짙은 자색이 탈색되는데 이 정도를 항산화 물질의 수소공여능으로 측정하는 방법이다. 측정 결과, Fig. 2(a)에서와 같이 헤마토코커스 추출물은 대조군인 알파-토코페롤과 비슷한 활성을 나타냈고, 반면 합성 아스타잔틴은 25 µg/mL 농도에서 15% 정도의 수준으로 낮은 활성을 보였다. 이것은 헤마토코커스 추출물내에 함유되어 있는 항산화물 나타내는 다른 카로티노이드에 의해 활성이 증가된 것으로 판단된다. 포접화합물의 경우

As- β -CD만이 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 20% 정도의 약한 활성을 나타내었고 (Fig. 2(b)), 다른 포접화합물은 농도를 높여도 활성을 나타내지 않았다.

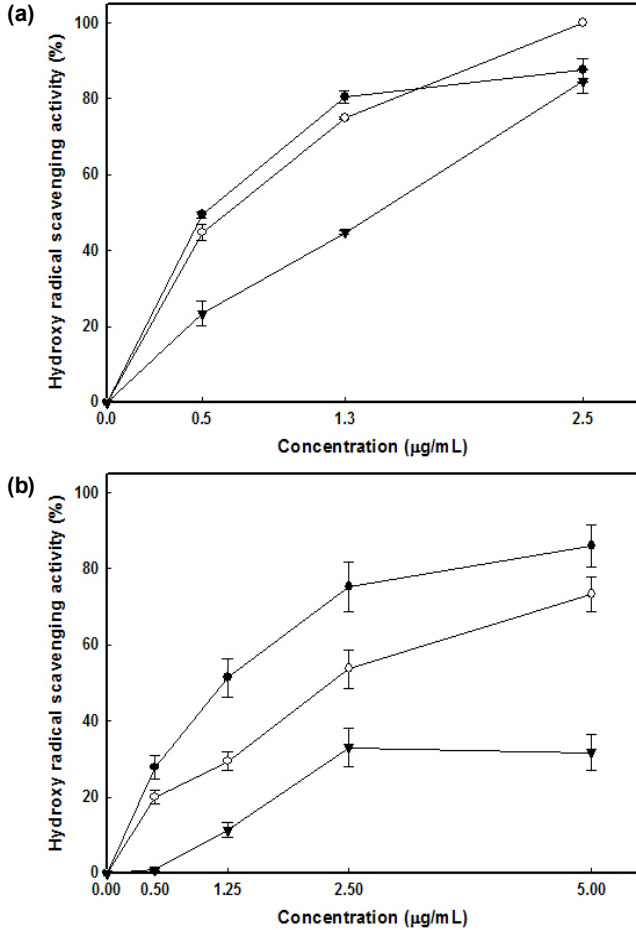


Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging effects of astaxanthin, *H. pluvialis* extract (a) and inclusion complexes (b). (a) : \bullet , α -tocopherol; \circ , astaxanthin; \blacktriangledown , *H. pluvialis* extract, (b) : \bullet , α -tocopherol; \circ , As- β -CD; \blacktriangledown , *H.p.*- β -CD.

다음으로 hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하였다. hydroxyl 라디칼은 활성산소 중반응성이 매우 강하여 생체 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Fe^{2+} 와 H_2O_2 가 반응하는 Fenton's reaction에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼이 2-deoxyribose를 산화시켜 malondialdehyde (MDA)로 분해시킨다. 이때 MDA를 530 nm에서 측정하여 hydroxyl 라디칼의 반응 정도를 측정하고자 하였다. 아스타잔틴의 경우 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 hydroxyl 라디칼을 100% 소거하였고, 헤마토크스 추출물도 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 80% 소거능을 나타냈다 (Fig. 3(a)). 그러나 포접화합물의 경우, As- β -CD가 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50% 수준의 소거능을 보였고, 다른 포접화합물도 낮은 활성을 나타냈다 (Fig. 3(b)). 이것은 아스타잔틴이 대조군인 알파-토코페롤에 비해 비

슷하거나 높은 활성을 나타내었으며, 라디칼 소거능이 높은 것으로 보고된 것과 일치하는 결과였다 [7,8]. 그러나 기존의 연구에서 보고되었던 알파-토코페롤보다 500배 이상의 활성차이는 *in vivo* 실험에서 얻은 결과로 *in vitro* 활성 측정에서는 확인이 어려울 것으로 판단된다. 이 점은 기존에 보고되었던 베타카로틴과 아스타잔틴의 항산화 활성에 대한 비교 연구결과에서도 확인할 수 있었다 [48]. 포접화합물의 항산화 활성을 검토한 결과, 포접전의 아스타잔틴보다는 낮은 활성을 나타냈고, 이러한 결과는 아스타잔틴이 충분히 유리되지 않아 활성이 발현되지 않아 나타난 결과로 판단된다. 기존의 보고에서도 포접된 물질의 *in vitro* 측정시에는 물질의 반응시간을 길게 수행한 분석법에서 활성이 충분히 발현되는 것으로 나타났다 [49,50].

미백활성

현재 아스타잔틴은 항산화와 함께 미백효과가 알려져 있어 화장품 소재로 활용되고 있다. 아스타잔틴의 미백활성은

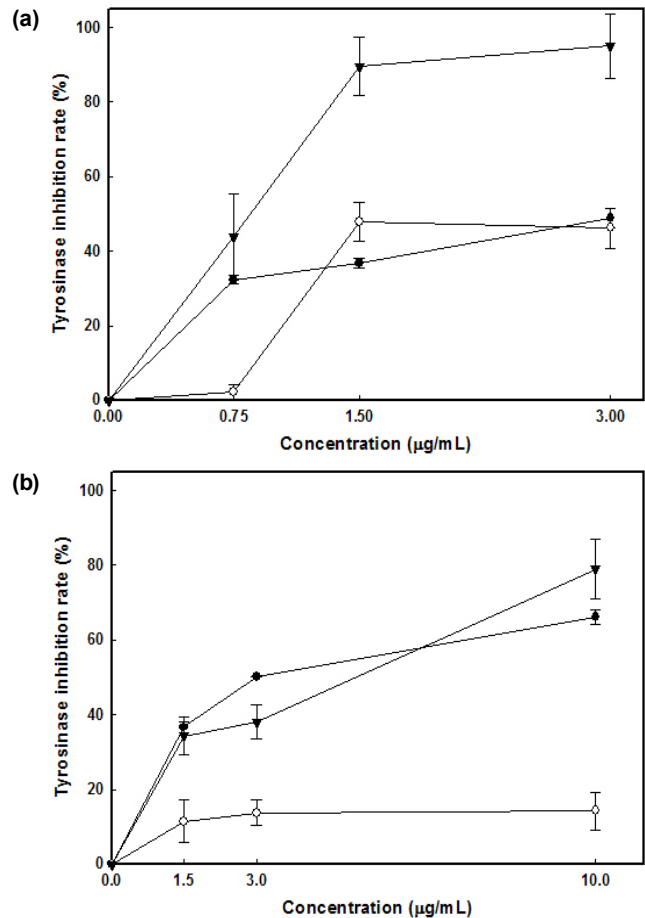


Fig. 4. Inhibition rate of astaxanthin, *H. pluvialis* extract (a) and inclusion complexes (b) on tyrosinase activity. (a) : \bullet , kojic acid; \circ , astaxanthin; \blacktriangledown , *H. pluvialis* extract, (b) : \bullet , kojic acid; \circ , As- β -CD; \blacktriangledown , *H.p.*- β -CD.

바 있다 [33]. 미백활성은 기존의 보고된 방법인 tyrosinase 대조군인 kojic acid와 비슷한 활성을 지니는 것으로 보고된 저해활성을 측정하여 평가하였다. 멜라닌 (melanin)은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 이 색소의 생합성 경로는 tyrosine을 출발 물질로 하여 dopaquinone을 거쳐 합성이 이루어지며 이후 아미노산 혹은 단백질과의 중합반응에 의해 최종적으로 멜라닌을 합성하게 된다. 본 실험에서 멜라닌 색소의 생합성 과정에서 tyrosinase가 L-dopa를 기질로 하여 초기 반응의 주요 과정을 촉진한다는 것을 이용하여 tyrosinase 활성의 저해도를 측정하는 방법을 사용하였다. 현재 강한 미백 물질로 알려져 있는 kojic acid를 대조군으로 비교하였다. Tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과 Fig. 4(a)에서 보는 바와 같이 모든 측정 농도에서 헤마토코커스 추출물이 대조군인 kojic acid보다 2배 이상의 활성을 나타내는 것으로 나타났다. Lee 등 (1999)의 연구에서 기존에 보고된 미백물질 박태기나무 추출물의 IC₅₀값이 20-50 µg/mL인 것과 비교하여 헤마토코커스 추출물은 IC₅₀값이 5 µg/mL 이하로 높은 활성을 나타내는 것을 확인하였다 [51]. 포접화합물에서도 포접전과 비슷한 결과로 헤마토코커스 추출물을 포접한 *H.p.*-β-CD의 활성이 10 µg/mL의 농도에서 약 80%의 저해능을 나타냈다 (Fig. 4(b)).

항암활성

아스타잔틴은 항산화 효과 외에 다양한 면역기능과 함께 항암작용을 하는 것으로 알려져 있고, 항암효과에 대한 많은 연구결과가 보고되었다 [14-18]. 그러한 항암효과는 항산화 작용에 기인하는 결과로 생각된다. 그 예로 아스타잔틴의 활성산소 (oxygen radical) 제거에 의한 개시 (cancer initiation)와 진행 (propagation)의 과정을 감소시켜 난소암, 간암에 대한 예방효과 등이 보고되었다 [11,12]. 본 연구에서는 일반적으로 사용되고 있는 유방암 세포주 (MCF-7), 자궁암 세포주 (HeLa)에 대해 아스타잔틴과 헤마토코커스 추출물의 항암활성을 측정하였다. 실험결과, 자궁암 세포주 (HeLa)에 대해서는 대조군인 5-fluorouracil (5-FU)과 비교하여 비슷하거나 높은 세포독성을 나타냈고, 유방암 세포주 (MCF-7)에 대해서는 대조군인 indol-3-carbinol (I₃C)의 50% 수준으로 활성을 나타냈다 (Fig. 5(a)). 포접화합물의 경우에도 자궁암세포주 (HeLa)에 대해서 *H.p.*-β-CD 포접화합물이 대조군인 5-FU와 비교하여 비슷한 활성을 나타냈다 (Fig. 5(b)). 이러한 결과는 포접화합물 형성전과 비슷한 결과였는데, 항암활성 측정법의 경우 시료주입 후, 24시간 배양시키기 때문에 긴 시간동안 포접되었던 물질의 활성이 충분히 발현되어 나타난 결과로 해석된다. Zirar 등 (2008)의 연구에서도 melarsoprol과 그것의 포접화합물의 혈액암 세포에 대한 저해능을 각각 48시간과 72시간 동안 배양 후 측정된 결과, 72시간 반응시 저해능이 1.5배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다 [49].

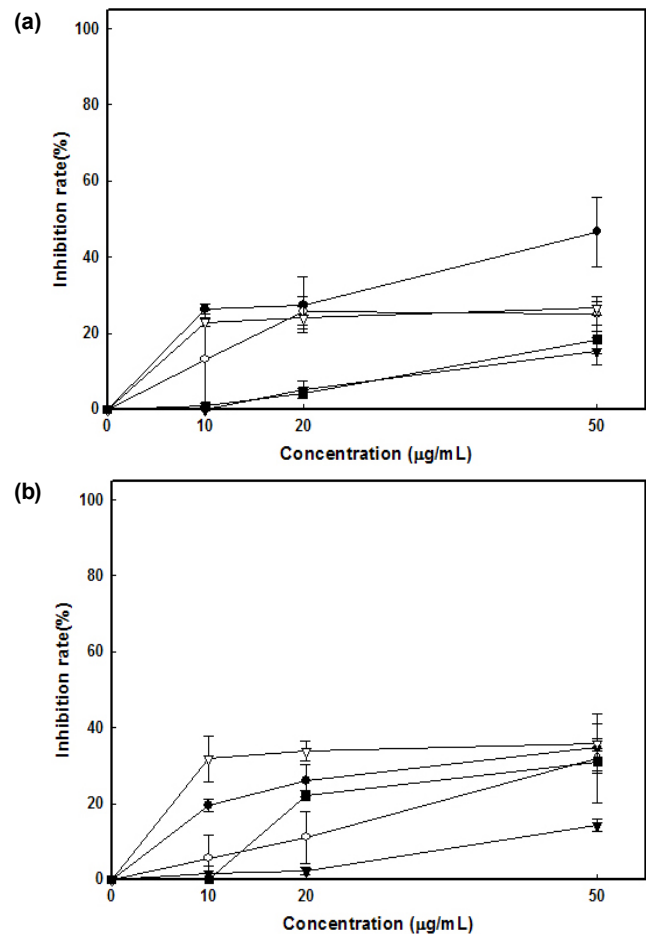


Fig. 5. Inhibitory effects of astaxanthin, *H. pluvialis* extract and inclusion complexes on the growth of cancer cell line MCF-7 (a) and HeLa (b) (—●—, I3C for (a) and 5-FU (b); —○—, astaxanthin; —▼—, As-β-CD; —▽—, *H. pluvialis* extract; —■—, *H.p.*-β-CD).

숙취해소 활성

항산화 물질의 숙취해소 효과를 함께 검토한 최근의 연구동향에 비추어 본 연구에서도 아스타잔틴의 숙취해소 효과를 검토하였다. 기존에 효모의 일종인 파피아 로도지마 (*Phaffia rhodozyma*)에서 추출된 아스타잔틴을 음료에 첨가하여 두통해소, 혈중 알콜농도 감소 등의 숙취해소 효과가 보고된 예가 있다 [52]. 간에서의 에탄올 대사는 주로 alcohol dehydrogenase (ADH)와 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해서 이루어진다. 이들 효소는 각각 acetaldehyde와 acetate를 형성하며 acetate는 acetyl-CoA로 전환되어 TCA 회로를 거쳐 에너지를 발생하거나 콜레스테롤과 지방을 합성하는데 이용된다. 본 실험에서는 알콜대사 산물인 β-NADH의 양을 측정하여 효소활성을 측정하였다. 즉 기질인 에탄올이 조효소 NAD의 존재하에서 대사되면서 생성되는 NADH의 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 ADH 활성을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 대조군으로 사용된

지구자 추출물에 비해 1.5배 높은 숙취해소 효과를 나타냈으며 아스타잔틴 포접화합물의 경우에도 대조군으로 사용된 지구자 추출물에 비해 높은 활성을 보였고, 이는 포접화합물 형성전과 비슷한 결과였다. 숙취해소 활성측정법의 경우 시료를 주입하고 25°C에서 충분히 예열시켜 주었다. 포접화합물의 용해도 조사에서 25°C에서 용해도가 증가하는 경향을 나타냈는데 [39], 그러한 포접화합물의 용해 특성에 의해 25°C에서 예열하는 도중 아스타잔틴이 충분히 수증으로 유리되어 포접전의 아스타잔틴과 비슷한 결과를 나타냈을 것으로 판단된다.

아스타잔틴과 포접화합물의 다양한 생리활성을 평가한 결과, 포접 후에도 생리활성을 나타내는 것을 볼 수 있었고, 포접의 특성상 장시간 반응이 이루어지는 평가에서 포접전과 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

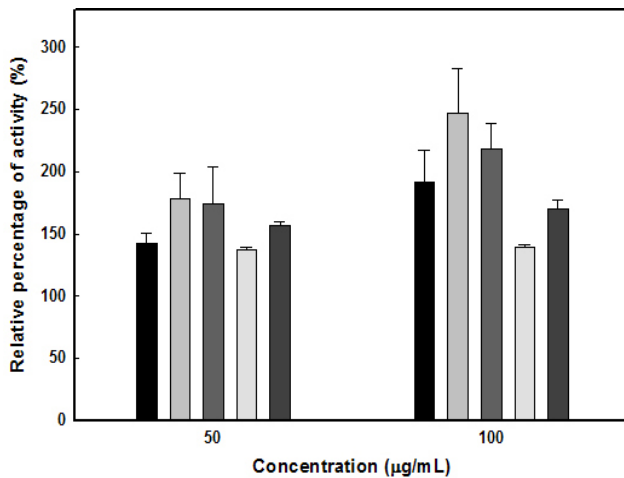


Fig. 6. Effect of astaxanthin, inclusion complexes and jiguja extract on alcohol oxidation activity (■, jiguja extract; □, astaxanthin; ▒, As-β-CD; ◻, *H. pluvialis* extract; ▓, *H.p*-β-CD).

요약

헤마토코커스로부터 아스타잔틴의 추출과 제형화의 유효성을 확인하고 적용성을 검토하고자 헤마토코커스 추출물과 아스타잔틴 포접화합물의 생리활성을 측정하였다. 그 결과, 헤마토코커스 추출물은 DPPH 라디칼 소거능, xanthine oxidase 저해 활성 및 hydroxyl 라디칼 소거능에 대해 *in vitro* 실험에서 활성을 나타냈다. 또한 헤마토코커스 추출물은 대조군인 kojic acid에 비해 동일한 농도에서 2배 이상의 미백활성을 나타냈고, 자궁암 세포주 (HeLa)에 대해 대조항암물질인 5-fluorouracil (5-FU)과 비슷한 항암활성을 나타냈다. 아스타잔틴은 또한 숙취해소 효과를 갖고 있는 것으로 확인되었는데, 대조군인 지구자 추출물에 비해 1.5배 높음을 알 수 있었다. 또한, 아스타잔틴과 싸이클로덱스트린의 포접화합물 As-β-CD와 헤마토코커스 추출물과 싸이클로

덱스트린의 포접화합물인 *H.p*-β-CD의 생리활성을 조사한 결과, As-β-CD는 대조군인 지구자추출물보다 높은 숙취해소 효과를 나타냈고, *H.p*-β-CD는 대조군인 kojic acid와 비슷한 수준의 미백효과를 나타냈다.

감사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역 혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

접수 : 2009년 9월 11일, 게재승인 : 2009년 12월 22일

REFERENCES

1. Shimidzu, N., M. Goto, and W. Miki (1996) Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish. Sci.* 62: 134-137.
2. Bendich, A. (1991) Non vitamin a activity of carotenoids: immuno enhancement. *Food Sci. Technol. Res.* 2: 127-130.
3. Miki, W. (1989) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 63: 141-146.
4. Palozza, P. and N. I. Krinsky (1992) Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*. *Meth. Enzymol.* 213: 403-420.
5. Hong, S. P., M. H. Kim., and J. K. Hwang (1998) Biological functions and production technology of carotenoids. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 1279-1306.
6. During, A., A. Nagao, and J. Terao (1998) β-carotene 15, 15-deoxygenase activity and cellular retinal-binding protein type II level are enhanced by dietary unsaturated triacylglycerols in rat intestines. *J. Nutr.* 128: 1614-1619.
7. Jorgensen, K. and L. Skibsted (1993) Carotenoid scavenging radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z. Lebensm. Unters Forsch* 196: 423-429.
8. Naguib, Y. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Chem.* 48: 1150-1154.
9. Lim, B. P., A. Nagao, J. Terao, K. Tanaka, T. Suzuki, and K. Takama (1992) Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1126: 178-184.
10. Nakagawa, K., S. Kang, D. Park, G. Handelman, and T. Miyazawa (1997) Inhibition by beta-carotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation. *J. Nutr. Sci. Vitamin* 43: 345-355.

11. Chew, B. P., J. S. Park, M. W. Wong, and T. S. Wong (1999) A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. *Anticancer Res.* 19: 1849-1854.
12. Jyonouchi, H., S. Sun, K. Iijima, and M. Gross (2000) Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutr. Cancer* 36: 59-65.
13. Marnett, L. J. (1987) Peroxyl free astaxanthin radicals : potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* 8: 1365-1373.
14. Batiha, A. (1993) Serum micronutrients and the subsequent risk of cervical cancer in a population-based nested case-control cancer epidemiology. *Biomarkers Prev.* 2: 335-339.
15. Bertram, J. S. (1991) Cancer prevention by retinoids and carotenoids : proposed role of GAP junctional communication. In : Vitamins and minerals in the prevention and treatment of cancer. *M. M. Jacobs*, CRC Press. Boca Raton 31-50.
16. Tomita, Y., K. Himeno, K. Nomoto, and H. Endo (1987) Augmentation of tumor immunity against synergistic tumors in mice by beta-carotene. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 679-681.
17. Kistler, A. (2002) Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 75: 665-675.
18. Kurihara, H. (2002) Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.* 70: 2509-2520.
19. Bendich, A. (1989) Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.* 119: 112-115.
20. Bendich, A. (1990) Carotenoids and the immune system. PP. 323-335. In: N. I. Krinsky, Carotenoids Chemistry and Biology. Plenum Press, New York.
21. Tomita, Y., H. Jyonouchi, R. W. Engelman, N. K. Day, and R. A. Good (1993) Preventive action of carotenoids on the development of lymphadenopathy and proteinuria in MRL-lpr/lpr mice. *Autoimmunity* 16: 95-102.
22. Breimer, L. H. (1990) Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage, *Mol. Carcinog.* 3: 188-197.
23. Yonouchi, J. (1993) Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr. Cancer* 19: 269-280.
24. Kritchevsky, S. B. (1999) β -Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *J. Nutr.* 129: 5-8.
25. Frei, B. (1995) Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 83-98.
26. Aghdassi, E. and J. P. Allard (2000) Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 880-886.
27. O'Connor, I. and N. O'Brien (1998) Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 16: 226-230.
28. Jacques, P. (1999) The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69: 198-205.
29. Lyle, B. J. (1999) Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the beaver dam eye study. *Am. J. Epidemiol.* 149: 801-809.
30. Seddon, J. M. (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 1413-1420.
31. Landrum, J. T. (1999) Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas. *Meth. Enzymol.* 299: 457-467.
32. Gradelet, S. (1998) Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 19: 403-411.
33. Jung, S. Y. (2005) Skin whitening ingredients containing astaxanthin. KR Application 10,2004,0021970.
34. Chen, X., R. Chen, Z. Guo, C. Li, and P. Li (2007) The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chem.* 101: 1-5.
35. Yun, M. J., J. H. Kim, H. Y. Choi, S. K. Kim, and Y. S. Gu (2003) The method for making astaxanthin water-soluble. KR Application 10,2003,0031200.
36. Lee, C. K. (2003) Process development for astaxanthin production by microalgae. Ministry of Maritime Affairs & Fisheries.
37. Higuera-Ciapara, I., L. Felix-Valenzuela, F. M. Goycoolea, and W. Arguelles-Monal (2004) Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydr. Polymers.* 56: 41-45.
38. Kittikaiwan, P., S. Powthongsook, P. Pavasant, and A. Shotipruk (2007) Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. *Carbohydr. Polymers.* 13: 1-8.
39. Kim, S. Y., E. A. Cho, K. H. Park, D. H. Kim, and H. J. Chae (2007) Development of formulation for astaxanthin by encapsulation. KR Application 10,2007,0069366.
40. An, B. J., J. Y. Lee, T. S. Park, J. R. Pyeon, H. J. Bae, M. A. Song, E. J. Baek, J. M. Park, J. H. Son, C. E. Lee, and K. I. Choi (2006) Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *curcuma longa* L. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 14: 168-172.
41. Heo, J. C., J. Y. Park, S. M. An, J. M. Lee, C. Y. Yun, H. M. Shin, T. K. Kwon, and S. H. Lee (2006) Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts

- by *gastrodia elata* blume. *Kor. J. Food Preserv.* 13: 83-87.
42. Kang, D. G and H. S. Lee (2001) An improved method in screening of superoxide and hydroxyl radical scavenging activities of plant medicinal extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* 32: 253-256.
 43. Jeong, M. S., G. S. Lee, and H. J. Chae (2004) *In vitro* biological activity assay of ethanol extract of radish. *J. Kor. Soc.* 47: 67-71.
 44. Oh, Y. H., S. B. Kim, G. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, U. Y. Lee, and T. S. Lee (2006) The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *Kor. J. Mycol.* 34: 105-111.
 45. Kurashige, M., M. Okimasu, and K. Utsumi (1990) Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* 22: 27-38.
 46. Barbosa, M. J., R. Morais, and G. Choubert (1999) Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout. *Aquaculture* 176: 331-341.
 47. Nishigaki, I., A. Dmitrovskii, W. Miki, and K. Yagi (1994) Suppressive effect of astaxanthin on lipid peroxidation induced rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 16: 161-166.
 48. Oshima, S., F. Ojiima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, and J. Terao (1993) Inhibitory effect of beta-carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nutr. Sci. Vitamin* 39: 607-615.
 49. Zirar, S. B., A. Astier, M. Muchow, and S. Gibaud (2008) Comparison of nanosuspensions and hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex of melarsoprol: Pharmacokinetics and tissue distribution in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 379: 181-186.
 50. Stražišar, M., S. Andrenšek, and A. Šmidovnik (2008) Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food Chem.* 110: 636-642.
 51. Lee, S. H., S. Y. Kim, J. J. Kim, T. S. Jang, and S. R. Chung (1999) The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.* 30: 397-403.
 52. Hong, N. D. (2005) Hangover curing agent containing astaxanthin and aspartic acid. KR Patent 10,0540498.