홍게 (*Chionoecetes japonicas* Rathbun) 껍질 색소의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성억제 효과

박병주¹, 백승오², 송영선³, 서영완^{2,4*}

Antioxidant and Nitric Oxide Inhibitory Activities of Pigments from *Chionoecetes japonicas* Rathbun

Byungju Park¹, Seung Oh Baek², Young-Sun Song³, and Youngwan Seo^{2,4*}

접수: 2014년 9월 12일 / 게재승인: 2014년 10월 13일

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In the present study, antioxidant activities of two crude pigments (acetone and MeOH) and their solvent fractions (*n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, and water fractions) from red crab shell were evaluated by measuring 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), peroxynitrites, and degree of production of reactive oxygen species (ROS) in HT 1080 cells as well as the extent of oxidative damage of genomic DNA purified from HT 1080 cells. From comparative analysis, 85% aq.MeOH fraction showed the strongest scavenging effect on both peroxynitrite *in vitro* and intracellular ROS in HT 1080 cells. Protective activities of these samples against hydroxyl radical-mediated genomic DNA damage were also investigated. 85% aq.MeOH and *n*-BuOH fractions significantly inhibited oxidative damage of purified genomic DNA. On the other hand, we investigated their inhibitory effects on

nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells. All samples significantly reduced NO production. Among the samples, *n*-hexane and water solvent fractions most effectively inhibited NO.

Keywords: *Chionoecetes japonicas*, Pigment, Antioxidant, Reactive oxygen species (ROS)

1. INTRODUCTION

색소는 식품첨가물로부터 화장품, 의약품에 이르기 까지 여러 가지 산업적 용도로 사용되기 때문에 경제적으로 매우 가치 있는 물질이며 이와 관련된 산업도 매년 매우 빠른 속도로 성장하고 있다. 특히 식품용 색소는 식품의 관능성과 기호성을 높이는 데 직접적인 영향을 미친다. 하지만 최근에 인공색소의 인체에 대한 발암성과 유해성이 알려진 반면에 천연색소는 독성도 거의 없을 뿐만 아니라 제조과정이 단순하여 환경오염도 거의 유발하지 않으므로 훨씬 인간 친화적이라고 할 수 있어 소비자들의 천연색소에 대한 관심이 증대되고 있다. 또한 천연색소는 항산화, 항균, 방취, 항염증 등 다양한 생리적 기능성이 알려짐에 따라 천연색소의 중요성이 더욱 강조되고 있다 [1,2]. 해양 생물에서 흔하게 발견되는 카로티노이드 (carotenoid) 색소는 탄소 40개인 테르펜 (terpene) 계열의 물질이며 크게 두 종류로 나누어지는데 산소를 포함하지 않는 카로틴 (carotene)류와 산소를 포함하는 크산토폰 (xanthophyll)류로 나눌 수 있다. 새우나 게와 같은 갑각류에서 발견되는 대표적인 크산토폰류로는 아스타잔틴 (astaxan-

¹부산일과학고등학교

¹Busanil Science High School, Busan 604-828, Korea

²한국해양대학교 해양환경생명과학부

²Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 606-791, Korea

³인제대학교 식의약생명공학과

³Center of Smart Foods and Drugs and Food Science Institute, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

⁴한국해양대학교 해양과학기술융합학과

⁴Ocean Science & Technology School, Korea Maritime and Ocean University Busan 606-791, Korea

Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-4750

e-mail: ywseo@kmou.ac.kr

thin)이 있다 [3-5].

우리나라 사람들이 즐겨먹는 수산물 중의 하나인 홍게 (*Chionoecetes japonicas* Rathbun)는 우리나라 동해안의 수심 200~2,000 m에서 어획되는 갑각류로서 부드러운 조직과 특유의 맛을 지녀 우리나라 사람들이 즐겨먹고 있으나 식용 부위는 15% 정도에 불과하고, 85%는 껍질로 폐기되어 버려지고 있다 [6]. 그러나 갑각류의 껍질에는 여러 가지 유용한 성분이 함유되어 있다. 기능성 식품소재로 널리 알려져 있는 키틴이 함유되어 있으며, 그 외에도 단백질, 회분, 향미성분, 아스타잔틴 같은 고부가가치 식품소재가 함유되어 있다 [7]. 키틴은 셀룰로오스 다음으로 지구상에 많이 존재하는 생분해성 고분자의 일종으로 환경, 식품, 의료 등 다양한 용도로 활용되고 있다. 홍게의 가공부산물 또한 최근 기능성 식품소재인 키틴 및 키토산의 제조 원료로 사용되고 있으나 키틴을 정제하는 공정과정에서 부산물로 얻을 수 있는 색소 등 다른 유용한 성분들은 거의 활용하지 못하고 그냥 폐기물로 버리고 있는 실정이다 [8].

홍게 가공부산물에 대해 수 편의 연구결과가 보고되었는데 Yoon 등은 홍게껍질을 효소로 가수분해하여 얻어진 가수분해산물들중에 분자량 3 kDa이하의 물질들은 산화스트레스 및 angiotensin I 전환 효소를 크게 억제하는 활성이 있음을 밝혔다 [9]. 홍게 가공부산물을 이용한 천연향미제 및 향기성분에 대한 연구도 이루어 졌다. Ahn 등은 홍게 자숙액의 농축에 따른 향기성분을 분석하여 대부분이 알데히드, 알칸류, 방향족화합물류, 알콜류, 케톤류, 함황화합물류, 함질소화합물류 및 테르펜류로 구성되어있음을 확인하였으며 또한 홍게 자숙액으로부터 계향 제조를 위해 반응향을 최적화하고 반응향을 적용한 계향미제의 휘발성 향기성분을 분석하였다 [10-12]. 또한 Jang등과 Baek등은 홍게 가공부산물의 단백질을 상업용 효소 (Flavourzyme 등)로 처리하고 반응표면 분석법으로 가수분해조건을 최적화함으로써 천연향미제를 개발하기 위한 원료로 이용하고자 하였으며 [13,14] Noh등은 효소적 가수분해에 의해 홍게껍질 단백질의 특성을 분석함으로써 홍게껍질의 기능성 소재로서의 활용 가능성을 탐색하였다 [15].

이와 같이 홍게의 향기 및 정미성분, 단백질 및 효소 가수분해산물 등에 대한 연구가 이루어졌으나 홍게의 색소성분에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 하지만 홍게 또한 갑각류의 일종이므로 아스타잔틴 계열의 카로티노이드가 주된 색소성분일 것으로 여겨진다. 아스타잔틴은 비타민 E와 β -카로틴보다 강한 자유 라디칼 소거활성을 가지고 있으며 [16, 17] 과산화상태에서 막의 인지질을 포함한 다른 지질들을 보호하는 기능을 가진 우수한 물질로 알려져 있으며 [18,19] LPS로 유도된 대식세포에서 NF- κ B 활성을 저해하여 iNOS의 발현 및 NO, IL-6, TNF- α 의 생성이 억제하는 것이 보고되었다 [20]. 따라서 본 연구에서는 홍게 껍질의 색소 추출물 및 그 용매 분획물을 제조하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), peroxynitrite 소거능, DNA 산화능, 세포내 ROS 소거능, NO (nitric oxide) 생성 억제능, GSH (glutathione) 유도

효과를 측정하여 홍게 껍질 색소가 기능성 식품소재로서의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 기기 및 시약

성분분석은 Dionex P580 pump (Dionex. corporation, Sunnyvale, CA, USA)와 Varian 350 refractive index detector (Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA)로 구성된 high performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 수행하였다. 사용된 모든 유기용매는 사용하기전 정제하여 실험에 사용하였으며, L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), DL-2-amino-3-mercapto-3-methylbutanoic acid (DL-penicillamine), dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 3-morpholinolinosydnonimine (SIN-1)과 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 그리고 peroxynitrite (ONOO⁻)와 astaxanthin 표준시약은 각각 Santa-cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)와 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

2.2. 색소추출물 제조 및 분획

본 실험에서는 2011년 동해안 폐기물로 나온 홍게 껍질을 건조하여 분쇄한 후 색소 추출물 및 분획물을 농도를 달리하여 제조하였다. 홍게 껍질 (1 kg)을 분쇄기로 분쇄 후 1차는 아세톤 (acetone) 용매로 2차는 메탄올 (MeOH) 용매로 침지 후 여과하는 방식을 사용하여 4일에 걸쳐 각각 2회씩 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출물을 감압회전증발기 (rotavapor)를 이용하여 용매 제거를 한 후, 아세톤 (4.84 g) 추출물과 메탄올 (14.76 g) 추출물을 얻었다. 각각의 추출물을 합한 후에 용매 분획을 실시하였다. 먼저 동량의 methylene chloride와 water의 혼합액을 만들어 층을 분리한 후, 분리된 methylene chloride 층을 2차 분획하여 *n*-hexane (1.73 g)층과 85% 메탄올 수용액 (85% aq.MeOH, 3.12 g)층을 얻었고, 물층도 2차 분획하여 *n*-butanol (*n*-BuOH, 6.06 g)층과 water (8.10 g)층을 얻었다.

2.3. 세포배양

인간섬유육종 세포주인 HT 1080 세포와 쥐의 대식세포인 Raw 264.7 세포는 한국세포주 은행 (KCLB, Korean cell line Bank)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10% FBS (fetal bovine serum)가 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Forma scientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 배지를 교환하고 6~7일 간격으로 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2.4. 카로티노이드 함량 분석

추출물의 carotenoid 함량은 astaxanthin 표준시약은 dichloro-

methane에, 추출물은 에탄올에 녹인 후 syringe filter (0.22 μ m, membrane, Corning, New York, USA)로 여과하여 이것을 HPLC용 시료로 사용하였다. 분석조건은 다음과 같다: column, Shiseido capcell Pack C₁₈ (5 μ m, 4.6×250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA); detection wavelength, 450 nm; flow rate, 0.6 mL/min; 이동상은 MeOH: ACN: dichloromethane을 44:44:12의 비로 11분 → 42:23:35의 비로 21분 → 44:44:12의 비로 분석하였다. 시료를 분석한 결과 HPLC 크로마토그램에서 retention time 6.3 min, 7.1 min, 7.5 min에서 세 개의 피크들이 나타났다.

2.5. DPPH 라디칼소거능 실험

DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 에탄올 15 mL에 녹인 용액 1.2 mL에 다시 에탄올 3 mL과 DMSO 0.5 mL을 혼합한다. 그리고 시료 50 μ L와 제조한 DPPH용액을 혼합하여 10 분간 상온에서 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼 소거 활성을 백분율로 나타내었으며, 대조군의 UV-Vis 흡광도는 0.94 ~0.97이 되도록 조정하였다. 그리고 3회 반복하여 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다. 시료는 100% 에탄올에 용해시켜 사용하였다 [21].

EDA (electron donating ability) (%) =

$$\frac{\text{대조군 흡광도}-\text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.6. Peroxynitrite 소거능 실험

ONOO⁻ 소거 활성은 Kooy등의 방법에 따라 dihydrorodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 [22]. ONOO⁻는 DHR13과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, rhodamine 123에 ONOO⁻와 SIN-1을 처리하고 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 시료의 peroxynitrite 소거능을 검토하였으며 대조군으로는 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였다.

DHR 123은 dimethylformamide에 녹여 질소로 퍼지시켜 -80°C에 보관하였고, DHR 123 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서 조제하여 사용하였다. 완충용액은 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절하여 100 M DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid)를 혼합하여 냉장보관하였고, buffer로 DHR 123을 5 M로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 완충용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5 분간 방치 후, Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하여 1시간동안 방치한 후 측정하였다. 이는 SIN-1이 NO와 O₂를 동시에 발생시켜 ONOO⁻를 생성시키는 화합물이기 때문에, DHR 123를 급

속하게 산화시키는 authentic peroxynitrite와 다르게 DHR 123를 점진적으로 산화가 일어나게 하기 때문이다. Blank는 0.3 N NaOH를 사용하였고, 실험은 삼중으로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

2.7. Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정

실험에 사용한 genomic DNA는 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer Inc., Alameda, CA, USA)를 이용하여 HT 1080 세포로부터 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 정량한 후, -20°C에서 냉동보관하여 사용하였다.

0.5~1.0 μ g의 genomic DNA에 4 μ L의 H₂O와 600 M의 FeSO₄, 0.5 mM의 H₂O₂를 각각 10 μ L씩 가하여 genomic DNA를 30분간 상온에서 산화시킨 뒤 130 mM의 EDTA를 가하여 반응을 중지시켰다. 산화된 genomic DNA는 6X agarose gel loading buffer와 mix하여 1% agarose gel에 loading하여 100 mV로 전기영동하였다. 전기영동을 마친 gel은 5 μ g/mL EtBr에 20~30분간 염색시켜 UV를 통해 산화된 정도를 확인하여 사용된 시약의 농도와 양을 조절하여 실험하였다 [23].

2.8. ROS (reactive oxygen species) 소거능 실험

세포내 활성산소종 소거효과는 섬유육종 세포인 HT 1080을 사용하였으며, 형광물질인 DCF-DA가 세포내 생성된 자유 라디칼과 반응하여 형광물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 측정하였다. 각 추출물과 용매 분획물은 200, 100, 50, 10 μ g/mL의 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500 M의 H₂O₂로 처리한 control과 시료와 H₂O₂로 모두 처리하지 않은 blank를 실험에 사용하였고, DCF fluorescence 값은 0분부터 120분까지 30분 간격으로 측정하였다.

세포 내 자유라디칼 생성 정도는 DCF-DA assay로 측정하였다. 섬유 육종 세포 HT 1080은 96 well plate에 5×10³ cells/well로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 희석한 20 μ M의 2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCF-DA, fluorescence probe)를 첨가하여 20분간 배양하였다. 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻은 후 2시간 동안 500 μ M의 H₂O₂를 처리하였다. 세포 내 자유라디칼 생성 정도는 Victor3 multilabel plate reader를 이용하여 $\lambda_{\text{excitation}}$ 485 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 528 nm에서 DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) 형광강도를 측정하였다 [24].

2.9. NO (nitric oxide) 생성 억제능 실험

LPS를 처리하여 NO 유도 후 생성되는 NO²가 Griess 시약과 반응하여 색소 화합물을 생성하는 원리를 이용하였다. 시료 처리 후 LPS를 48시간 동안 처리하여 NO의 생성을 유도하

였으며 시료를 처리하지 않고 LPS만 처리한 control과 LPS로 처리하지 않은 blank를 대조군으로 하여 백분율(%)로 비교하여 나타내었다.

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 1×10^4 cells/mL로 well당 100 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle Medion (MEM)으로 교체한 뒤 준비된 시료를 처리한 후 1시간 동안 배양하였다. 그 뒤, NO 생성을 유도하기 위해 1 μ g/mL (1 PPM)의 LPS를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간동안 배양하였다. LPS에 의해 자극받은 Raw 264.7 세포로부터 생성된 NO가 함유된 배지 50 μ L와 Griess 시약 (0.1% N-1-naphtylenediamine : 1% sulfanilamide = 1:1) 50 μ L를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다 [25].

2.10. GSH (glutathione) 유도효과 실험

세포내 축적된 GSH함량은 thiol staining reagent인 mBBR (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 비형광물질인 mBBR은 세포내 산화생성물을 제거하는 역할을 하는 GSH와 결합하여 형광을 나타내기 때문에, 이를 측정하여 GSH의 함량을 계산하였다.

HT 1080 세포는 fluorescence microtiter 96 well plate에 웰당 1×10^7 cell/mL가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 웰에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양하였다. 각 well은 PBS buffer로 씻은 후 40 M mBBR을 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 반응시킨 뒤, 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 $\lambda_{excitation}$ 360 nm, $\lambda_{emission}$ 465 nm에서 Victor3 multilabel plate reader로 측정하였다 [26].

2.11. 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정

하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (mean) $\pm$ 표준오차 (standard error of mean, SEM)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 statistic analysis system v9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Carotenoid 함량

아스타잔틴의 동정은 표준시약과 retention time을 비교하여 retention time 6.3분에 나오는 피크로 확인되었다. 7.1분과 7.5분에 나오는 피크들은 아스타잔틴 유도체로 여겨지나 표준시약을 구하기가 어려워 어떤 성분인지 확인하지 못하였다. 하지만 문헌에 의하면 [27] 갑각류로부터 아스타잔틴의 에스터 유도체들이나 이성질체들이 보고된 바 있어 이와 유사한 물질들일 것으로 추측된다. HPLC로 분석한 결과 홍게 껍질의 총 carotenoid 함량은 홍게껍질 100 g 당 157.5 μ g 함유하고 있는 것으로 확인되어 홍게 껍질의 총 carotenoid 함량비는 약 0.16%인 것으로 계산되었다. 아직까지 홍게껍질의 카로티노이드 함량에 대해서 보고된 바는 없으나 우리나라 동해안에 서식하는 또 다른 종류의 대게 (*Chionoecetes opilio*)와 동일종에 대한 카로티노이드 함량은 껍질 100 g당 14 mg으로 보고된 바 있다 [27]. 하지만 추출용매가 다르고 계의 종류도 다르기 때문에 단순히 이 수치를 가지고 함량을 비교하기는 어렵다. HPLC 크로마토그램에서 retention time 6.3분에 나오는 피크가 단일성분이라는 가정하에 아스타잔틴은 카로티노이드 함량의 약 50%를 차지하는 것으로 여겨진다.

Fig. 1. Scavenging effects of two crude pigments and their solvent fractions from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on DPPH radical. ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq. MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol, BHA: butylated hydroxyanisole.

3.2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 색변화를 일으키므로, 항산화능을 측정할 때 DPPH 라디칼 소거 측정법이 많이 이용된다. Fig. 1은 시료의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 보여 주며 각 시료의 농도는 50, 100, 200 µg/mL에서 라디칼 소거능을 측정하였다. 50 µg/mL의 농도에서 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, water 분획은 각각 16.8, 17.8, 16.9, 9.6%의 낮은 소거능을 보였으며 농도를 증가시켜도 대조군 BHA에 비해서 라디칼 소거능은 크게 증가하지 않았다. 문헌에 의하면 아스타잔틴의 DPPH 라디칼 소거능은 25 µg/mL의 농도에서 15%의 낮은 소거능을 보인 것으로 보고되었다 [28]. 따라서 아스타잔틴이나 그 유도체들을 주성분으로 함유하는 색소추출물의 용매분획들이 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내는 것은 문헌치와 잘 일치하는 것으로 판단된다.

3.3. Peroxynitrite 소거능

Peroxynitrite (ONOO⁻)는 생체내에서 NO와 O₂⁻가 동시에 발생하는 조건에서 라디칼-라디칼 반응으로 쉽게 생성된다. 이 물질은 자유라디칼은 아니지만 생존기간이 매우 짧고 NO나 O₂⁻보다 훨씬 반응성이 강하며 특히 염증 감염 등과 같이 특정한 상태에서 peroxynitrite가 대량 생성되어 강한 조직과 괴력을 나타내는 것으로 알려져 있다 [29]. Fig. 2와 3은 시료의 농도에 따른 authentic peroxynitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대한 소거능을 나타낸 것이다. 각 추출물과 분획물, 대조군의 농도는 200, 100, 50, 10 µg/mL로 희석하여 사용하였으며 ONOO⁻ 소거 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율 (%)로 나타내었다. 이때, SIN-1은 NO와 O₂⁻를 동시에 발생시켜 ONOO⁻를 생성시키는 화합물로, ONOO⁻의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화를 일으킨다. SIN-1을 처리하였을 때, 조추출물에서는

Fig. 2. Scavenging effects of two crude pigments and their solvent fractions from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on authentic peroxynitrite. ^{a-p}Means with the different letters at the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

Fig. 3. Scavenging effects of two crude pigments and their solvent fractions from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on peroxynitrite from the decomposition of SIN-1. ^{a-p}Means with the different letters at the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

MeOH 추출물이 acetone 추출물보다 뛰어난 소거 활성을 보였으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약 60%의 소거율을 보였다. Authentic ONOO⁻에 대한 소거효과도 acetone 추출물보다 MeOH 추출물이 더 좋은 소거효과를 나타내었으며 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 60%의 소거율을 보여 주었다.

위의 실험 결과를 바탕으로 홍게껍질 추출물에 대한 순차적인 용매분획을 통해 4개의 분획층 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH 그리고 H₂O 분획층을 얻었으며, 이들에 대한 ONOO⁻ 소거 효과를 측정하였다. 모든 분획층이 ONOO⁻ 소거활성을 보여 주었으나 85% aq.MeOH 분획물이 가장 좋은 소거효과를 나타내어 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 authentic peroxynitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxynitrite에 대해서 각각 약 80%와 65%의 소거활성을 보여주었다 (Fig. 2, 3). 이러한 결과를 바탕으로 비교적 극성이 큰 물질들이 peroxynitrite 소거효과를 나타낸다고 생각된다.

3.4. Genomic DNA 산화능

HT 1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 각 시료로 처리한 후, H₂O₂와 FeSO₄로 산화시켜 시료가 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. Fig. 4는 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료농도에서 대조군과 비교한 genomic DNA의 산화정도를 나타낸 것이다. 대조군으로는 시료로 처리하지 않고 산화시킨 control과 시료, H₂O₂, FeSO₄ 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 실험 결과 조추출물에서는 acetone추출물과 MeOH추출물이 서로 비슷한 정도로 산화를 어느 정도 억제시켰고, 분획물 중에서는 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획이 가장 좋은 산화 억제력을 보였다.

3.5. 세포내 ROS(reactive oxygen species) 소거능

Fig. 5와 6은 각각 추출물 및 용매분획의 농도에 대한 ROS 소

거효과를 시간에 따라 나타낸 것이다. 대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 급격한 증가를 보였으며, blank는 그 값의 변화가 거의 없었다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 60분을 기준으로 홍게 껍질 추출물의 ROS 소거능은 MeOH 추출물 (51%)이 acetone 추출물 (37%)보다 좋았으며 농도감소에 따른 소거능 감소의 정도도 MeOH 추출물이 acetone 추출물의 소거능 감소보다 더 작았다. 각 용매 분획물에서는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 85% aq.MeOH 분획물 (85%)이 소거율이 가장 높았으며, 그 다음으로는, *n*-hexane 분획물 (59%), *n*-BuOH 분획물 (42%), H₂O 분획물 (14%) 순이었다. 특히 85% aq.MeOH 분획물의 경우에는 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 blank와 거의 같은 정도로 매우 높은 소거활성을 보여주었으며 120분 경과 시에서도 blank와 비슷한 정도의 소거율을 나타내었다. 이러한 실험결과를 고려할 때 85% aq.MeOH 분획물에는 강한 항산화 작용을 하는 물질이 있음을 유추해 볼 수 있다.

3.6. NO(nitric oxide) 생성 억제능

NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 물질로 체내방어기능, 신호전달기능, 혈액응고, 혈관확장 등 다양한 생리활성을 보이지만 NO의 생성량이 과도하게 높아지면 염증성 질환이 발생할 수 있고, 또 superoxide와 결합하여 생성되는 peroxynitrite (ONOO⁻)는 암을 유발시키고 DNA 손상을 일으키는 등 인체에 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 인체에 NO의 농도를 적정하게 유지하는 것은 매우 중요하다 [30,31].

홍게 껍질 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발인자인 NO생성 억제율을 확인하였다. Fig. 7은 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서 추출물 및 용매분획의 농도에 따른 NO 생성 억제효과를 나타낸 것이다. 추출물의 NO 생성 억제능은 200 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 acetone 추출

Fig. 4. Protective effects of two crude pigments and their solvent fractions from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on genomic DNA oxidation from HT-1080 cells. ^{a-p}Means with the different letters at the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

Fig. 5. Scavenging effects of two crude pigments from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on intracellular ROS induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT 1080 cells in 20 μ M DCF-DA, cells were treated with sample for 2 h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 μ M H_2O_2 at $\lambda_{excitation}=485$ nm and $\lambda_{emission}=528$ nm. (a) acetone extract, (b) methanol extract.

Fig. 6. Scavenging effects of solvent fractions of combined crude pigments from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on intracellular ROS induced by hydrogen peroxide. After preincubation of the HT 1080 cells in 20 μ M DCF-DA, cells were treated with sample for 2h. DCF fluorescence was measured following addition of 500 μ M H_2O_2 at $\lambda_{excitation}=485$ nm and $\lambda_{emission}=530$ nm. (a) *n*-Hexane. (b) 85% aqueous methanol. (c) *n*-butanol. (d) Water.

물이 약 40%의 억제능을 보였고, MeOH 추출물에서는 각 농도별로 크게 차이가 없는 25~35% 정도의 억제능을 보였다. 분획물에서는 200 μ g/mL의 농도에서 *n*-hexane 분획물 (52%) 과 H_2O 분획물 (50%)에서 유사하게 높았으며, *n*-BuOH 분획

물 (38%), 85% aq.MeOH 분획물 (37%) 순이었다. 이때, *n*-hexane 분획물과 H_2O 분획물은 blank와 크게 차이가 없는 높은 억제효과를 나타내었다.

Fig. 7. Inhibitory effect of two crude pigments and their solvent fractions from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on NO production in LPS induced Raw 264.7 cells. Raw 264.7 macrophages cells were pretreated with samples for 1h before stimulation with LPS (1 µg/mL) for another 48 h. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

Fig. 8. Effect of two crude pigments and their solvent fractions from *Chionoecetes japonicus* Rathbun on regulation of GSH level in HT 1080 cells. MeOH: methanol, 85% aq.MeOH: 85% aqueous methanol, *n*-BuOH: *n*-butanol.

3.7. GSH 유도효과

Glutathione (GSH)은 감마 펩타이드 결합을 가지고 있는 트리 펩타이드로서 ROS에 의해서 산화되어 glutathione disulfide (GSSG)를 형성함으로써 세포성분의 손상을 방지한다. 대부분은 세포질에 존재하면서 외부로부터의 산화 스트레스나 생체내 자유라디칼을 제거하는 역할을 한다 [32]. 실험 결과 추출물과 분획층은 모두 유의적인 GSH 유도 효과를 나타내지 않았다. 문헌에 보고된 바에 의하면 HepG2-C8 cell세포에서 아스타잔틴의 농도가 3.13 µM일 때부터 GSH가 유의적으로 증가되기 시작하였다. 이미 위에서 기술한 바와 같이 추출물에 들어 있는 카로티노이드의 총함량 (추출물 1 mg당 62 µg)을 감안하면 이 농도에 훨씬 못 미치는 때문에 유의적인 GSH 증가 효과를 나타내지 않는 것으로 여겨진다 [33].

4. CONCLUSION

본 연구는 홍게껍질 색소 성분의 항산화 활성 효과를 확인함으로써 우리나라 갑각류 껍질에 포함되어 있는 색소 성분의

중요성을 밝히고자 하였다. 실험 결과, 홍게껍질 색소 추출물의 peroxynitrite와 세포내 ROS 소거능 및 NO 생성 억제 효과와 genomic DNA 산화 방지능은 확인하였으나 DPPH 라디칼 소거효과는 크지 않았고, GSH 유도효과는 유의적으로 나타나지 않았다. Peroxynitrite와 ROS 소거능은 85% aq.MeOH 분획물에서 가장 높아 이 분획물에서 항산화 활성이 높은 화합물이 존재할 것으로 여겨진다. 또한, NO 생성 억제능은 *n*-hexane 분획물과 물 분획물에서 비교적 높게 나타나 85% aq.MeOH 분획물에 존재하는 물질과 또 다른 종류의 물질들이 존재할 수 있음을 보여 주었다. 특히, 85% aq.MeOH 용매 분획물이 높은 peroxynitrite 및 세포내 ROS 소거율, 그리고 genomic DNA 산화 억제능을 보여 주어 새로운 항산화제로서의 이용 가능성을 보여 주었다. 지금까지 아스타잔틴은 양식산업에서 연어류의 착색제로 이용되어 왔으며 최근에는 항산화, 항암 등의 생리활성이 발견되어 기능성 물질로도 연구가 진행되고 있다 [34]. 본 연구결과는 그 동안 폐기물로 분류되어 버려지던 홍게껍질을 재활용하면 항산화제 혹은 항산화능을 가진 착색제 및 식품첨가제 등으로 개발될 수 있는 가능성이 있음을 제시하여 준다. 추후의 지속적인

연구를 통하여 항산화 및 항염증 효과를 가진 새로운 건강기능성 물질을 분리하여 고부가가치화 할 수 있다면 폐기물의 재활용이란 친환경적인 측면에서도 의미가 있을 것이다.

Acknowledgements

본 연구는 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력양성사업의 연구결과입니다.

REFERENCES

- Choi, J. H. (2010) Green tech for human. *Tech & Future* 10: 28-31
- Griffiths, J. C. (2005) Coloring foods & beverages. *Food Technol-Chicago* 59: 38-44.
- Cheesman, D. F. and J. Prebble (1966) Astaxanthin ester as a prosthetic group: a carotenoprotein from the hermit crab. *Comp. Biochem. Physiol.* 17: 929-935.
- Fox, D. L. (1973) Chitin-bound keto-carotenoids in a crustacean carapace. *Comp. Biochem. Physiol.* 44B: 953-962.
- Higuera-Ciapara I., L. Flix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci.* 46: 185-196.
- Jang, J. T., W. H. Seo, and H. H. Baek (2009) Enzymatic hydrolysis optimization of a snow crab processing by-product. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 622-627.
- No, H. K. and S. P. Meyers (1992) Utilization of crawfish processing wastes as carotenoids, chitin, and chitosan sources. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 319-326.
- Noh, K. H., K. H. Min, B. Y. Seo, S. H. Kim, Y. W. Seo, and Y. S. Song (2012) Characteristics of protein from red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell by commercial proteases. *Korean J. Nutr.* 45: 429-436.
- Yoon, N. Y., K. B. Shim, C. W. Lim, and S. B. Kim (2013) Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of red snow crab *Chionoecetes japonicas* shell hydrolysate by enzymatic hydrolysis. *Fish. Aquat. Sci.* 16: 237-242.
- Ahn, J. S., W. J. Cho, E. J. Jeong, and Y. J. Cha (2006) Changes in volatile flavor compounds in red snow crab *Chionoecetes japonicus* cooker effluent during concentration. *J. Korean Fish. Soc.* 39: 437-440.
- Ahn, J. S., E. J. Jeong, and Y. J. Cha (2014) Volatile flavor compounds of a crab-like flavoring base made using reaction flavor technology. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 102-109.
- Ahn, J. S., E. J. Jeong, W. J. Cho, and Y. J. Cha (2014) Optimal conditions of reaction flavor for synthesis of crab-like flavorant from snow crab cooker effluent. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 128-134.
- Baek, J. H., E. J. Jeong, S. Y. Jeon, and Y. J. Cha (2011) Optimal conditions for enzymatic hydrolysate of snow crab *Chionoecetes japonicus* cooker effluent using response surface methodology. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 99-103.
- Jang, J. T., W. H. Seo, and H. H. Baek (2009) Enzymatic hydrolysis optimization of a snow crab processing by-product department of food engineering. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 622-627.
- Noh, K. H., K. H. Min, B. Y. Seo, S. H. Kim, Y. W. Seo, and Y. S. Song (2012) Characteristics of protein from red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell by commercial proteases. *Korean J. Nutr.* 45: 429-436.
- Guerin, M., M. E. Huntley, and M. Olaizola (2003) Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21: 210-216.
- Kurahige, M., E. Okimasu, M. Inoue, and K. Utsumi (1990) Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22: 27-38.
- Naguib, Y. M. A. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agr. Food Chem.* 48: 1150-1154.
- Palozza, P. and N. I. Krinsky (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 291-295.
- Kwak, T. W., J. Y. Cha, C. W. Lee, Y. M. Kim, B. H. Yoo, S. G. Kim, J. M. Kim, S. Park, and W. G. An (2011) Anti-Inflammatory and antioxidant effect of astaxanthin derived from microalgae. *J. Life Sci.* 21: 1377-1384.
- Blois, M. S. (1998) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
- Kooy, N. W., J. A. Royal, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman (1994) Peroxynitrite mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 149-156
- Milne, L., P. Nicotera, S. Orrenius, and M. Burkitt (1993) Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 102-109.
- Okimoto, Y., A. Watanabe, E. Niki, T. Yamashita, and N. Noguchi (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474: 137-140.
- Nataliya, B. and N. Andrei (2005) A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide* 13: 93-97.
- Poot, M., A. Verkerk, J. F. Koster, and J. F. Jongkind (1986) De novo synthesis of glutathione in human fibroblasts during in vitro ageing and in some metabolic diseases as measured by a flow cytometric method. *Biochim. Biophys. Acta* 883: 580-584.
- Shahidi, F. and J. Synowiecki (1991) Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1527-1532.
- Kim, S., E. Cho, G. Yoo, J. Yoo, S. M. Son, M. J. In, D. C. Kim, and H. J. Chae (2009) Physiological activity of astaxanthin and its inclusion complex with cyclodextrin. *KSBB J.* 24: 570-578.
- Virag, L., E. Szabo, P. Gergely, and C. Szabo (2003) Peroxynitrite induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.* 140-141: 113-124.
- Epe, B., D. Ballmaier, I. Roussyn, K. Briviba, and H. Sies (1996) DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res.* 24: 4105-4110.

31. Bordan, C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2: 907-916.
32. Pompella, A., A. Visvikis, A. Paolicchi, V. Tata, and A. F. Casini (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1499-1503.
33. Saw, C. L. L., A. Y. Yang, Y. Guo, and A. N. T. Kong (2013) Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway. *Food Chem. Toxicol.* 62: 869-875.
34. Higuera-Ciapara, I., L. Felix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci.* 46: 185-196.