

카라기난의 유기산 가수분해물의 기능 특성

주동식^{1*} · 조순영²

¹한중대학교 외식산업학과

²강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

Physiochemical Properties of Carrageenan Hydrolysates by Organic Acids

Dong-Sik Joo^{1*} and Soon-Yeoung Cho²

¹Dept. of Foodservice Industry, Hanzhong University, Donghae 240-713, Korea

²East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate various physiochemical activities of carrageenan hydrolysates obtained with organic acid treatments. The hydrolysates treated with citrate and malate at 100°C, 110°C and 120°C had antimicrobial activities against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Especially, the hydrolysates with malate at 120°C for 180 min treatment had the strongest antimicrobial activity to *Bacillus subtilis*. Regardless of the hydrolysis conditions, inhibition ratios of tyrosinase activity by citrate and malate under 100~120°C were over 97%. Especially, the inhibition ratios for tyrosinase activity of the hydrolysates obtained with citrate at 100°C for 180 min and at 120°C for 90 min were 99.4% and 98.2%, respectively. Also, the inhibition ratios for tyrosinase activity of the hydrolysates obtained with malate under the same conditions were about 99.5% and 99.3%, respectively. The APTT as anticoagulant activity of carrageenan hydrolysates with 0.3% malate and citrate at 80°C for 180 min were 2,451±18 (sec) and 1,617±15 (sec), respectively.

Key words: carrageenan hydrolysates, antimicrobial activity, tyrosinase inhibition activity, anticoagulant activity

서 론

카라기난은 황산기를 다량 함유하고 있는 대표적인 해조 다당의 하나로 특유의 물성으로 인해 식품산업 분야에 널리 이용되고 있다(1,2). 한편, 황산기를 함유하는 당질이 항암작용, 항혈액응고작용 및 항균작용 등의 생리활성을 가지는 경우가 있는 것으로 보고된 바 있으며(3,4), 카라기난 다당을 효소(5) 또는 유기산(6)으로 가수분해하여 가수분해 카라기난 당질의 생리활성을 이용하려는 일련의 연구가 진행된 바 있다. 특히 저농도 유기산을 이용한 카라기난의 저분자화를 통해 카라기난 당질의 기능성식품 소재로서의 활용을 위한 연구가 진행되고 있다(6).

본 연구는 카라기난 다당을 기능성식품 소재로 활용하기 위해 유기산으로 처리하여 얻어진 저분자 카라기난 당질의 기능 특성을 시험하여, 그 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

시험 시료

실험에 사용한 시료는 Joo와 Cho(6)가 보고한 카라기난

가수분해물의 제조 조건으로 제조한 것으로 즉, 카라기난(carrageenan)은 국내에서 생산되는 κ-형(MSC Co., Korea)을 사용하였고, 초산, 구연산, 젖산, 사과산, 숙신산 등의 유기산은 시판 제품(Sigma Co., USA)을 구입하여 이용하였다. 0.3~0.5% 농도의 유기산 용액에 카라기난을 1% 농도가 되게 첨가하여 80~120°C의 가열 조건에서 각 반응시간에 따라 가수분해 처리하여 얻어진 시료를 사용하였다.

환원당 및 분해율 측정

환원당은 Somogyi-Nelson 법(7) 즉, 시료용액 1 mL와 동(銅)시약 1 mL를 test tube에 각각 취하고 water bath에서 20분간 가열하여 산화 제1동(Cu₂O)을 생성시켰다. 여기에 폴리브덴 용액 1 mL를 가하여 발색시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선으로부터 환원당을 정량하였다. 전당은 phenol-sulfuric acid(8) 즉, 시료용액 0.5 mL에 5% phenol 용액 1 mL 첨가하여 섞은 후 황산 5 mL를 직하시켜 20분간 상온방치하여 발색시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선으로부터 전당 함량을 측정하였다.

Sephadex G-15 chromatography

기능특성이 확인된 시료는 활성 확분을 확인하기 위하여

*Corresponding author. E mail: dsjoo777@yahoo.co.kr
Phone: 82 33 520 9253, Fax: 82 33 520 9252

Sephadex G-15 수지를 이용하여 겔 크로마토그래피를 행하였다. 유리칼럼(φ2.5 cm×100 cm)에 80 cm 정도 수지를 충전한 다음, 시료를 동결건조하여 일정량(1.0 g)을 물(5~10 mL)에 녹인 후 칼럼에 loading하여 증류수(pH 7.0)로 용출시켰다. 용출된 시료를 fraction collector를 이용하여 튜브에 각각 6 mL씩 분획하였다. 얻어진 획분별로 전당과 환원당 함량을 측정하였고, 전당과 환원당 함량에 따라 용출 획분을 분리하여 생리활성을 재측정하였다.

항균활성 및 항충치 활성

카라기난의 분해조건별로 얻어진 유기산 가수분해물의 항균활성을 paper disk 법으로 측정하였다(9). 즉, 멸균 petri dish에 nutrient agar를 15 mL씩 부어 평판을 만들고 시험균주들을 37°C에서 12시간 배양시킨 균액을 면봉을 이용하여 petri dish 상에 도말하여 접종하고, 25°C에서 2시간 전배양시킨 후 paper disk(8 mm, Advance Toyo, Japan)를 평판 위에 올려놓고 그 위에 0.45 μm membrane filter로 여과한 가수분해물 25 및 50 μL를 멸균 마이크로피펫으로 가한 후 37°C로 조절된 배양기에서 배양하였다. 배양 12시간과 24시간 경과후 paper disk 주위의 투명환의 생성 여부로 항균성 유무를 판별하였고, 대조실험은 0.5% 유기산 용액에 1% 농도로 카라기난을 용해한 것을 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주는 *B. cereus* KCTC 3674, *B. subtilis* KCTC 3729, *E. coli* KCTC 1039, *St. aureus* KCTC 1928 및 *Ent. aerogenes* KCTC 2190 등으로 유전자은행(KCTC, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다.

항충치능은 충치균 배양 배지인 BHI(brain heart infusion) broth에 1.5% agar를 첨가하여 기충용 배지를 만들어 멸균 petri dish에 분주하여 미리 평판을 제조하였고, 중충용 배지(0.75% agar 함유)를 2.5 mL씩 시험관에 분주한 다음 멸균한 후 50°C 정도로 식힌 후 시험균액을 0.1 mL씩 가하여 잘 혼합하고 기충 배지용 평판에 도포한 다음 응고시켰다. 여기에 paper disk를 놓고 0.45 μm filter paper로 여과한 시험 용액을 일정량 분주한 다음 4°C에서 1시간 방치한 후, 37°C로 조절된 CO₂ 배양기(Sanyo Co., Japan)에서 48시간 배양한 다음 투명환을 관찰하였다. 사용된 균주는 *St. mutans* KCTC 3065로 KCTC로부터 분양받아 사용하였다.

Bifidobacterium 생육 촉진능

여과기로 제균된 시험 시료 1 mL를 멸균된 10 mL MRS 배지(0.005% L-cysteine 함유)가 들어있는 시험관에 가하여 37°C, 48시간 배양한 다음 성장 정도를 650 nm에서 흡광도를 측정하여 상대값으로 나타내었다(10). 사용한 비피더스균은 *Bifidobacterium infantis* KCTC 3127, *Bifidobacterium longum* KCTC 3128로 유전자은행(KCTC, Korea)에서 분양받은 것이었다.

Tyrosinase 활성 저해능 측정

Tyrosinase 활성 저해능 측정은 tyrosine을 멜라닌으로

산화시키는 phenoloxidase의 활성을 저해하는 능력을 측정하였다(11). 즉, 시료용액 1 mL에 0.05% tyrosinase 용액 0.1 mL와 1/15 인산 완충액(pH 6.8) 0.9 mL를 가하여 25°C, 10분간 가온하였다. 여기에 0.03% DOPA(3,4-dihydroxyl-phenyl alanine, pH 6.8) 1 mL를 가하여서 25°C에서 5분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다(D₁). 한편, 가열하여 실패시킨 효소를 이용하여 동일한 실험을 행한 것(D₂)과 시료 무첨가 실험(D₃)으로부터 저해율을 산출하였다.

$$\text{효소활성 저해율(\%)} = \frac{D_3 - D_1}{D_3 - D_2} \times 100$$

ACE(angiotensin-I converting enzyme) 저해능 측정

ACE 저해능은 일정 농도의 유기산 분해물 용액 50 μL에 ACE 조효소액 200 μL 및 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 200 μL를 가한 후 37°C에서 5분간 전반용시켰다. 여기에 기질로서 Hippuryl-His-Leu 용액(25 mg/2.5 mL sodium borate buffer) 100 μL를 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 500 μL를 가하여 반응을 정지시켰다(공시험은 시료 대신에 증류수를 사용하였으며, 대조구는 1 N HCl 500 μL를 가한 다음 ACE 조효소액 200 μL를 가함). 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초간 vortex한 후, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 1 mL를 취하였다. 이것을 완전히 건조시킨 후 증류수 3 mL를 가하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 ACE 저해율을 계산하였다(12).

$$\text{ACE 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

여기서, A는 시료 첨가구의 흡광도, B는 시료 무첨가구의 흡광도. 단, A, B 모두 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

항혈액응고능 측정

혈장은 정맥혈 9.0 mL를 채취하여 1 mL의 sodium citrate(3.8%) 용액과 혼합한 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은 -20°C에 저장해 두고 실험에 사용하였다. 활성 트롬보플라스틴 시간 측정(APTT, activated partial thromboplastin time)은 혈장 10 μL를 넣고 교반한 후 37°C 항온수조에서 3분간 가온하였다. 여기에 100 μL actin을 첨가한 후 다시 37°C 항온수조에서 3분간 가온하였다. 3분이 되는 순간 미리 37°C로 가열하여둔 0.025 M CaCl₂ 용액 100 μL를 넣음과 동시에 응고시간을 측정하였다. 프로트롬빈 시간 측정(PT, prothrombin time)은 37°C 항온수조에서 1분 이상 미리 가온하여둔 thromboplastin C 200 μL에 37°C에서 미리 5분 이상 가온하여둔 혈장과 시료용액 혼합액(혈장:시료용액-10:1)을 가함과 동시에 응고시간을 측정하였다(3).

세포성장 억제작용

세포성장 억제작용은 WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(nitrophenyl)-2H-5-tetrazolia]-1,3-benzene disulfonate) 방법을 이용하여 측정하였다(Roche Applied Science Inc., Germany). U-937 세포를 96 well plate에 10^4 cells/mL 농도로 심은 후 10% fetal bovine serum이 포함된 DME 배양액에서 키웠다. 세포의 수가 6,000 cells/mL 정도로 배양되면 배양액을 2% fetal bovine serum이 포함된 배양액으로 교환하고 12시간 preincubation을 해주었다. 그 다음으로 실험하고자 하는 시료를 0.1% 농도로 처리하고, 세포의 성장속도에 따라 36~48시간 정도 경과하면 배양액에 직접 WST-1용액을 처리하여, 1~2시간 incubation한 후 plate reader로 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험의 결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었으며, 유의성을 검정하기 위해 ANOVA 분석을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

결과 및 고찰

항균 및 항충치 활성

카라기난 가수분해물의 항균활성을 시험한 결과(Table

1), citrate와 malate를 가수분해 매체로 이용할 경우, 100°C, 110°C 및 120°C 가수분해물은 *B. cereus*와 *B. subtilis*에 강한 항균활성을 나타내었으며, 상대적으로 약하지만 *E. aerogenes*나 *S. aureus*에 대해 항균활성을 나타내었다. 특히 malate로 120°C에서 180분간 가수분해한 것이 *B. subtilis*에 대해 특히 강한 항균활성을 나타내었다. 아울러 *St. mutans* 균을 이용한 카라기난 가수분해물의 항충치 효과를 시험한 결과, 전 시험구에서 충치균 증식 억제 효과가 확인되지 않았다.

Bifidus균 증식효과

본 실험에서 행한 카라기난 가수분해물의 장내 비피더스균 증식효과는 일반적으로 올리고당이 장내 비피더스균의 증식을 촉진하는 bifidus factor로 널리 알려져 있는(13,14) 것과는 달리 비피더스 증식능이 전혀 확인되지 않았다(Table 2).

Tyrosinase 활성 저해능

카라기난 가수분해물의 tyrosinase 활성 저해능을 실험한 결과(Table 3), 100°C 및 120°C에서 처리된 시료 중에서 citrate와 malate 처리구가 97% 이상의 높은 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 확인되었다. Citrate로 100°C에서 90분 처리된 시료의 경우 97.1%, 180분 처리된 것은 99.4%의 저해활성을 나타내었고, 120°C에서 90분 처리된 시료의 경

Table 1. Antimicrobial and anticavity activity of carrageenan hydrolysates treated by organic acids

Test strains	Citrate ¹⁾					Malate				
	80 ²⁾	90	100	110	120	80	90	100	110	120
<i>B. cereus</i>	+ ³⁾	+	++	++	++	+	++	++	++	++
<i>St. aureus</i>			+	+	+		+	+	+	+
<i>E. coli</i>	±	±	+			±	±	+		+
<i>B. subtilis</i>	±	+	++	++	++	+	+	++	++	+++
<i>E. aerogenes</i>	±	±	+	+	+	±	±	±	+	+
<i>St. mutans</i>										

¹⁾Preparation conditions of test samples: hydrolysis time, 180 min; organic acid concentration, 0.5%.

²⁾Temperature of hydrolysis.

³⁾Sample injection concentration for test: 0.2~0.5 mg (as total sugar).

Antimicrobial activity detected from clearzone size; $\phi < 8.5$ mm, ± 8.5 mm $< \phi < 9.0$ mm, $+ 9.0$ mm $< \phi < 11.0$ mm, $++ 11.0$ mm $< \phi < 13.0$ mm, $+++ \phi > 15.0$ mm.

Table 2. Effect of carrageenan hydrolysates treated by organic acids for growth of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium longum*

Hydrolysis temp (°C)	Hydrolysis time (min)	Citrate ¹⁾		Lactate		Malate	
		<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>
100	60	0.144±0.006 ^{2)bc3)}	0.115±0.003 ^c	0.221±0.004 ^a	0.101±0.007 ^c	0.141±0.008 ^b	0.095±0.002 ^b
	180	0.102±0.012 ^d	0.132±0.014 ^a	0.103±0.008 ^d	0.138±0.009 ^a	0.116±0.011 ^c	0.121±0.004 ^d
110	60	0.111±0.002 ^d	0.112±0.005 ^c	0.115±0.005 ^c	0.114±0.002 ^b	0.115±0.002 ^c	0.111±0.006 ^a
	180	0.179±0.015 ^a	0.120±0.010 ^b	0.180±0.011 ^b	0.102±0.008 ^c	0.148±0.016 ^b	0.108±0.011 ^a
120	60	0.140±0.012 ^b	0.110±0.009 ^c	0.125±0.011 ^c	0.102±0.011 ^c	0.214±0.015 ^a	0.122±0.005 ^a
	180	0.123±0.007 ^c	0.091±0.004 ^d	0.168±0.014 ^b	0.116±0.012 ^b	0.124±0.007 ^c	0.106±0.002 ^a

¹⁾Organic acid concentration: 0.5%, sugar concentration of hydrolysate: 10 mg/mL.

²⁾OD value on 650 nm (mean±SD, n=3).

³⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Tyrosinase activity inhibition of carrageenan hydrolysates treated by organic acids

Hydrolysis temp. (°C)	Citrate ¹⁾		Lactate		Malate	
	90 ²⁾	180	90	180	90	180
100	97.1 ³⁾	99.4	82.1	94.2	98.5	99.5
120	98.2	85.4	85.0	86.1	99.3	85.9

¹⁾Organic acid concentration: 0.5%, sugar concentration of hydrolysate: 10 mg/mL.

²⁾Hydrolysis time (min).

³⁾Inhibition ratios of tyrosinase activity (%).

우 98.2%의 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 한편, malate 처리구도 처리온도와 처리 시간에 따라 약간의 차이는 있지만 전체적으로 citrate 처리구와 비슷한 결과로 98~99.5%의 높은 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다. 아울러 다른 유기산의 경우에도 처리 조건에 따라 다소의 차이는 있지만 75% 이상의 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다. 아울러 120°C에서 180분 처리된 시료의 경우 유기산의 종류에 관계없이 85% 이하로 같은 억제능이 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 과도한 분해로 분자량이 일정 크기 이하로 작아지면 tyrosinase 활성 저해 효과가 낮아지

는데, 이러한 결과는 황산기 함량과 관계가 있는 것으로 여겨진다. 한편, 활성이 높았던 시료를 선정하여 Sephadex G-15 칼럼 크로마토그래피를 시행하여 얻어진 각획분의 tyrosinase 활성 저해 효과를 검증하였다. 그 결과 0.5% citrate로 100°C에서 90분 처리한 시료의 경우 크로마토그래피로 5개의 획분을 얻었으며 각 획분의 tyrosinase 활성 저해 효과를 시험한 결과, 환원당과 전당 함량이 가장 많았던 C-3 획분이 85% 정도의 tyrosinase 활성이 저해되는 것으로 확인되었다(Fig. 1, 2). 0.5% malate로 100°C에서 90분 처리된 시료의 경우에도 5개의 획분으로 분획되어 각 획분의 tyrosinase 활성 저해 효과(Fig. 3, 4)는 M-4 획분에서 약 50%, M-3 획분에서 30% 정도의 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 확인되었다. 이 두 시험 획분의 경우 환원당 및 전당 함량이 가장 높은 구간에서 높은 활성을 나타내었다. 동일한 농도의 citrate와 malate를 사용하여 100°C, 180분간 처리 시료와 120°C, 90분간 처리 시료에서도 tyrosinase 활성 저해 효과가 나타났다. 아울러 정제 과정 중에 유기산 성분이 제거됨으로써 활성 저해효과가 다소 낮아지는 것으로 여겨졌다.

Fig. 1. Sephadex G-15 chromatogram of carrageenan hydrolysates treated with 0.5% citric acid at 100°C for 90 min.

Fig. 3. Sephadex G-15 chromatogram of carrageenan hydrolysates treated with 0.5% malic acid at 100°C for 90 min.

Fig. 2. Tyrosinase activity inhibition ratios of each fraction (Fig. 1) obtained from Sephadex G-15 chromatography of carrageenan hydrolysate.

Fig. 4. Tyrosinase activity inhibition ratios of each fraction (Fig. 3) obtained from Sephadex G-15 chromatography of carrageenan hydrolysate.

Table 4. Inhibition ratio of angiotensin-I converting enzyme by carrageenan hydrolysates treated by organic acids

Hydrolysis temp. (°C) ¹⁾	Acetate		Citrate		Lactate		Malate		Succinate	
	A ²⁾	B	A	B	A	B	A	B	A	B
80	9.5±1.1 ³⁾⁴⁾		9.9±1.4 ^a		16.8±1.2 ^b		27.7±0.9 ^a		13.8±2.8 ^a	
100	10.4±2.1 ^b	4.5±1.3 ^b	9.3±2.2 ^a	10.5±0.7 ^a	19.1±2.5 ^a		17.7±2.3 ^b		11.2±2.6 ^a	
120	18.2±2.4 ^a	11.3±1.5 ^a	5.0±0.5 ^b	11.4±1.2 ^a	19.4±2.2 ^a		13.1±1.6 ^c		12.8±1.4 ^a	

¹⁾Hydrolysis time: 180 min.²⁾Organic acid concentration (%): A 0.3, B 0.5, sugar concentration of hydrolysate: 10 mg/mL.³⁾Mean±SD (n=3).⁴⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.**Table 5. Anticoagulant activity of carrageenan hydrolysates treated by organic acids**

(APTT: sec)

Hydrolysis Temp. (°C) ¹⁾	Acetate		Citrate		Lactate		Malate		Succinate	
	A ²⁾	B	A	B	A	B	A	B	A	B
80	627.1±4.7 ³⁾⁴⁾	395.2±9.5 ^a	1617.5±15.5 ^a	598.4±12.3 ^a	1272.4±8.9 ^a	721.5±7.2 ^a	2451.3±18.2 ^a	1008.2±9.1 ^a	1040.5±7.9 ^a	930.3±8.3 ^a
90	328.5±10.1 ^b	140.1±4.9 ^b	357.2±8.5 ^b	124.5±6.7 ^b	296.1±8.9 ^b	148.2±9.4 ^b	618.8±7.9 ^b	242.5±8.6 ^b	276.1±15.4 ^b	137.3±8.1 ^b
100	93.9±3.7 ^c	72.6±5.2 ^c	68.1±4.5 ^d	82.8±7.1 ^c	82.9±3.3 ^c	61.2±4.1 ^c	79.0±2.9 ^c	75.1±3.2 ^c	65.1±1.9 ^c	60.2±2.8 ^c
110	39.6±2.1 ^d	39.2±1.6 ^d	82.1±3.2 ^c	74.2±4.5 ^c	39.0±1.1 ^d	38.1±1.8 ^d	47.1±1.5 ^d	52.8±2.3 ^d	39.1±1.4 ^d	41.2±1.7 ^d
120	39.0±2.0 ^d	41.0±1.4 ^d	42.1±1.3 ^e	44.1±2.0 ^d	41.2±2.5 ^d	43.7±2.4 ^d	35.7±1.4 ^e	52.0±1.2 ^d	39.9±2.1 ^d	42.1±1.7 ^d

¹⁾Hydrolysis time: 180 min.²⁾Organic acid concentration (%): A 0.3, B 0.5, sugar concentration of hydrolysate: 10 mg/mL.³⁾Mean±SD (n=3).⁴⁾Values with different superscripts within the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

ACE 저해능

일반적으로 특정의 저분자 peptide에서 ACE 저해능이 발현되는 것으로 널리 알려져 있는데(15), 본 실험의 대상인 카라기난 가수분해물의 경우는 유기산 종류, 처리 온도 및 처리 조건에 관계없이 ACE 저해능이 없는 것으로 확인되었다(Table 4).

항혈액응고활성

카라기난 유기산 가수분해물의 항혈액응고활성을 시험한 결과는 Table 5와 같다. 일반적으로 황산기를 가진 다당류가 항혈액응고활성을 가지는 것으로 널리 알려져 있는데(4), 본 실험의 카라기난은 대표적인 황산 해조다당으로 얻어진 카라기난 가수분해물도 황산기를 함유하고 있다. 이 때문에 가수분해시킨 카라기난 가수분해물도 충분히 항혈액응고활성이 있을 것으로 판단되며 실험 결과, 대조실험으로 카라기난을 각종 유기산에 녹여 항혈액응고활성을 측정할 결과 전혀 활성이 없는 것으로 확인되었으며, 이는 실험과정에서 카라기난 자체가 쉽게 응고하는 것이 그 원인인 것으로 여겨졌다. 그러나 분해온도와 시간을 달리하여 얻어진 시료들은 대체로 항혈액응고활성을 나타내었는데 실험 조건 즉, 가수분해정도에 따라서 항혈액응고활성이 큰 차이를 나타내었다. 특히 상대적으로 저온인 80°C에서 가수분해되어진 시료의 경우 APTT가 대개 20분이 넘는 높은 혈액응고 저지 작용이 나타났다. 유기산 종류에 따라서도 그 활성은 차이를 나타내고 있는데, 0.3% malate 용액으로 80°C에서 180분간 처리는 시료의 경우 APTT가 2,451±18(sec)로 항혈액응고활성이 가장 높았으며, 동일한 조건에서 얻어진 0.3% citrate

가수분해물이 1,617±15(sec)이었으며 lactate, succinate, acetate 가수분해물 순으로 높았다. 아울러 동일 유기산일지라도 다른 농도에서 만들어진 가수분해물은 그 활성에 있어서 커다란 차이가 있다는 것으로 확인되었는데, 0.3% malate 용액으로 80°C에서 180분간 처리 시료의 경우 APTT가 2,451±18(sec)인 반면, 0.5% malate 용액에서 가수분해된 시료의 경우 1,008±9(sec)로 항혈액응고활성이 1/2이하로 떨어진다 것을 확인하였다. 아울러 다른 종류의 유기산에서도 그러한 경향은 동일하게 나타났다. 한편 가수분해 온도에 따른 결과를 비교해보면 80°C에서 가수분해한 시료에 비해 10°C 높은 90°C에서 가수분해한 시료의 경우는 1/3정도로 활성이 떨어지는 것이 확인되었다. 이상의 결과로부터 유기

Fig. 5. Comparison of anticoagulant activities of carrageenan hydrolysate, fucoidan and heparin.

H-heparin (18 µg/mL), F-fucoidan (50 µg/mL), C-carrageenan hydrolysate (50 µg/mL).

Fig. 6. Comparison of cell growth inhibition activity of carrageenan hydrolysates.

Sample 1 and 3 were each treated by 0.5% acetate and 0.5% lactate at 100°C for 180 min. Sample 6, 7 and 9 were each treated by 0.5% acetate, 0.5% citrate and 0.5% malate at 100°C for 90 min. Sample 12, 13, 14 and 15 were each treated by 0.5% citrate, 0.5% lactate, 0.5% malate and 0.5% succinate at 100°C for 90 min. Sample 16, 17, 18 and 20 were each treated by 0.5% acetate, 0.5% citrate, 0.5% lactate and 0.5% succinate at 110°C for 180 min. Sample 21, 22, 23 and 24 were each treated by 0.5% acetate, 0.5% citrate, 0.5% lactate and 0.5% malate at 120°C for 90 min. Sample 26 was treated by 0.5% acetate at 120°C for 180 min.

산 농도가 높아질수록, 가열온도가 높을수록 가수분해도가 높아지는 것(6)과 깊은 상관성이 있는 것으로 여겨지는데, 특히 가수분해가 진행됨에 따라 분자량이 적어지고 결국은 황산기 함량도 낮아지게 됨으로써 항혈액응고능이 낮아지는 결과를 가져오는 것으로 여겨졌다. 한편 heparin과 fucoidan 그리고 본 실험에서 얻어진 80°C, 0.3% malate 용액 가수분해물의 항혈액응고활성을 상대비교한 결과(Fig. 5) 정제 fucoidan이 가장 높은 활성을 나타내었고, heparin과 carrageenan 가수분해물이 비슷한 활성을 나타내었다.

세포성장 억제 작용

각 조건에서 가수분해되어진 카라기난 가수분해물들의 세포 증식 억제능 실험을 행한 결과(Fig. 6), 0.5% acetate로 100°C에서 90분 처리된 시료가약 45% 정도의 세포증식을 억제하는 것으로 나타났고 0.5% lactate로 100°C에서 180분 처리된 시료에서 40% 정도의 세포증식을 억제하는 것으로 나타났으며, 그 외의 시료 중에서는 주목할 만한 세포 증식 억제능을 보인 확분은 나타나지 않았다.

요 약

유기산으로 분해된 카라기난 가수분해물의 각종 생리활성을 실험한 결과, citrate와 malate를 가수분해 매체로 이용할 경우, 100°C, 110°C 및 120°C 가수분해물은 *B. cereus*와 *B. subtilis*에 강한 항균활성을 나타내었으며, 120°C에서 180분간 가수분해한 것이 *B. subtilis*에 대해 특별히 강한 항균활성을 나타내었다. 그러나 충치균인 *St. mutans*에 대한 항

균활성은 없는 것으로 확인되었다. Tyrosinase 활성 저해 효과는 100°C 및 120°C에서 처리된 시료 중에서 citrate와 malate 처리구가 97% 이상의 높은 tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 확인되었다. Citrate로 100°C에서 90분 처리된 시료의 경우 97.1%, 180분 처리된 것은 99.4%의 저해 활성을 나타내었고, 120°C에서 90분 처리된 시료의 경우 98.2%의 tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 한편, malate 처리구도 처리온도와 처리시간에 따라 약간의 차이는 있지만 전체적으로 citrate 처리구와 비슷한 결과로 98~99.5%의 높은 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다. 당질 농도에 따라 tyrosinase 활성 저해 효과가 다르게 나타났으며, 환원당 및 전당의 농도에 비례하는 것을 확인할 수 있었다. 항혈액응고활성은 유기산의 종류에 따라 차이를 나타내고 있는데, 0.3% malate 용액으로 80°C에서 180분간 처리 시료의 경우 APTT가 2,451±18(sec)로 항혈액응고활성이 가장 높았으며, 동일한 조건에서 얻어진 0.3% citrate 가수분해물이 1,617±15(sec)였으며 lactate, succinate, acetate 가수분해물 순으로 높았다. 가수분해가 진행됨에 따라 분자량이 적어지고 결국은 황산기 함량도 낮아지게 됨으로써 항혈액응고활성이 낮아지는 것으로 여겨졌다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터의 지원에 의한 것입니다.

문 헌

1. Rees DA. 1969. Structural conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv Carbohydr Biochem* 24: 267 332.
2. Harris P. 1990. *Food gels*. Elsevier Applied Science, London. p 79 120.
3. Nishimo T, Nagumo T. 1992. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydr Res* 229: 355 362.
4. Hirata A, Itoh W, Tabata K, Kojima T, Itoyama S, Sugawara I. 1994. Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 406 407.
5. Joo DS, Cho SY, Lee EH, Yang ST. 1999. Preparation of carrageenan oligosaccharides using carrageenase from *Pseudomonas alcaligenes* JCL 43 and its functional properties. *Korean J Life Sci* 9: 423 429.
6. Joo DS, Cho SY. 2003. Preparation of carrageenan hydrolysates from carrageenan with organic acid. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1 5.
7. Somogyi M, Nelson N. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19 23.
8. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1958. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 28: 350 356.
9. Lorian V. 1991. *Antibiotics laboratory medicine*. Williams & Wilkins, Baltimore. p 17 105.
10. Teraguchi S, Uehara M, Ogasa K, Mitsuoka T. 1978.

- Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Jpn J Bacteriol* 33: 753-758.
11. Horowitz NH, Fling M, Macleod HA, Sheoka N. 1960. Genetic determination and enzymatic induction of tyrosinase in *Neurospora*. *J Mol Biol* 2: 96-104.
 12. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
 13. Bullen CL, Teale PV, Willis AT. 1976. Bifidobacteria in the intestinal tract on infants: an *in vivo* study. *J Med Microbiol* 3: 335-344.
 14. Kim CR. 1999. Use of galactooligosaccharides from cheese whey for growth of *Bifidobacteria*. *Korean J Food & Nutr* 12: 50-54.
 15. Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, Tomizuka N, Suzuki H. 1987. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric Biol Chem* 51: 1581-1586.

(2006년 10월 25일 접수; 2007년 2월 13일 채택)