

감마선 조사된 저분자 laminarin의 항산화 활성 연구

최종일*, 김현주, 이주운

Antioxidant Activity of Low Molecular Weight Laminarin Prepared with Gamma Irradiation

Jong-il Choi*, Hyun-Joo Kim, and Ju-Woon Lee

접수: 2011년 7월 6일 / 게재승인: 2011년 11월 7일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, it was investigated the antioxidant activity of laminarin degraded by gamma irradiation. Because the activities of antioxidants have been attributed to various mechanisms, different assay methods have been conducted and compared. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power, and lipid peroxidation inhibitory activity of degraded laminarin were measured and compared with non-degraded. All of these results showed that the antioxidant activity of laminarin degraded by irradiation was increased depending on the absorbed dose. Therefore, gamma irradiation could be an alternative method for the preparation of degraded laminarin with higher antioxidant activity.

Keywords: laminarin, gamma irradiation, degradation, antioxidant

1. 서론

Laminarin은 갈조류에 다량 함유되어 있는 저장다당류로서 Painter [1] 및 Percival과 McDowell [2]은 갈조류로부터 저분자 laminarin을 분리, 정제하여 구조분석을 수행한 결과 주로 β -1,3 결합으로 구성된 glucan이었으며, β -1,6결합을

35%정도 함유하였다고 보고하였다. Laminarin은 구조적 특성으로 인해 β -glucan과 유사한 생리활성을 나타내며, 특히 식물 및 동물의 면역활성 증진효과, radioprotective, antitumor 및 antibacterial activity에 관여한다고 보고되고 있다 [3]. 이러한 Laminarin은 정제도, 용해도 및 분자량의 크기 등에 따라 생리활성이 달라진다고 보고되었다 [4]. 그러나 해조류 내 함유된 laminarin은 다양한 기능성을 가졌음에도 불구하고 fucoidan, 알긴산 등과 같은 다른 다당류에 비해 연구가 비교적 미진한 실정으로 이를 활용하기 위한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다.

최근 다양한 종류의 천연 항산화제들이 보고되어 있지만, vitamin C나 tocopherol만이 항산화제로서 사용되고 있는 실정이다. 우수한 항산화력과 낮은 가격 때문에 널리 사용되고 있는 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene와 butylated hydroxyanisole는 과량 섭취 시 심각한 병을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있고 [5], 인체에 독성을 나타내어 사용규제를 받고 있다. 반면에 추출물에서 유래된 천연 항산화제의 경우, 그 항산화 효과가 낮고 가격이 상대적으로 비싸다는 단점이 있어 [6], 보다 안전하고 효력이 강한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다. Laminarin의 경우에도 항산화 활성이 보고되었지만, 상용되고 있는 항산화제보다 낮은 활성으로 인하여 활성 증진을 위한 전환공정 개발이 요구되고 있다.

감마선 조사는 식품 및 의료기기의 미생물학적 안전성 확보를 위한 기술로 사용되어 왔다. 최근의 연구에서 감마선 조사에 의하여 polysaccharide, protein과 같은 거대 생물분자의 구조가 변환된다는 사실이 밝혀지면서, 감마선 기술을 이용한 구조변환 및 기능성 증진에 관한 연구가 많은 관심을 끌고 있다. laminarin과 구조가 유사한 β -glucan의 경우, 감마

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소
Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, 1266 Sinjeong-dong, Jeongeup 580-185, Korea
Tel: +82-63-570-3210, Fax: +82-63-570-3207
e-mail: choiji@kaeri.re.kr

선 조사에 의하여 저분자화가 될 경우, 항산화 활성과 면역 활성이 증가된다는 것이 보고되었으나 [7], 아직까지 감마선 조사에 의해 분해된 laminarin의 항산화에 관한 연구는 보고 되지 않았다. 이에, 본 연구에서는 감마선 조사된 laminarin의 항산화 활성을 여러 가지 방법을 이용하여 평가하여 감마선 조사에 의해 분해된 laminarin의 항산화 활성 영향을 평가하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 감마선 조사

본 연구에서 사용한 laminarin은 Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)사에서 구입하여 사용하였으며 증류수를 이용하여 10 mg/mL의 농도로 용해하여 실험에 사용하였다.

감마선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소 (Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, ^{60}Co 감마선 조사시설 (point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, Canada)을 이용하였다. 준비된 시료를 실온에서 시간당 10 kGy의 선량율로 0, 10, 30, 50, 100 및 200 kGy의 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량의 확인은 alanine dosimeter (5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구 (International Atomic Energy Agency)의 규격에 준용하여 표준화 한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 $\pm 2\%$ 이내였다.

2.2. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Kim *et al.* [8]의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL에 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 1 mL을 넣고 교반한 후 30분 동안 실온에 정지한 다음 반응 용액을 분광광도계 (UV-1601PC spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음의 계산식에 의하여 계산되었다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.3. Ferric reducing antioxidant power

시료 1 mL, sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) 1 mL과 1% potassium ferricyanide 1 mL을 혼합하여, 50°C에서 20분간 방치한 후, 10% trichloroacetic acid 1 mL을 가하여 혼합한 후, 13,400 \times g에서 5분 동안 원심 분리하였다. 상층액 1 mL을 증류수 1 mL 및 ferric chloride (1 mg/mL) 0.1 mL과 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 [8].

2.4. Rancimat test

Laminarin의 항산화지수를 알아보기 위해 Metrohm Rancimat Model 743 (Herisan, Switzerland)를 이용하여 알아보았다. 대조군으로 대두유 5 g을 사용하였으며, 시료 처리군으로는

대두유 4 g, 각 시료 1 g 및 유허제 0.1 g을 넣어 사용하였다. 측정값을 산화보호지수로 환산하여 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{산화보호지수 (Pf)} = \frac{\text{시료 처리군 산패 시간}}{\text{대조군 산패 시간}}$$

2.5. 지질산패도 측정

Laminarin의 지질산패도를 측정을 위해 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)를 이용하였다. 분쇄 돈육 5 g에 증류수 15 mL을 혼합하여 균질화 (DIAX 900, Heidolph Co., Ltd., Germany)를 하였다. 균질액에 각 시료 1 mL을 혼합한 다음 37°C에 저장하여 1시간 간격으로 3시간동안 저장하였을 때의 지질산패도를 측정하였다. 균질액 1 mL에 TBA/TCA 혼합액 (20 mM TBA in 15% TCA) 3 mL 및 7.2% butylated hydroxytoluene 용액 50 μL 를 혼합한 다음 90°C에서 15분간 반응하였다. 반응 후 냉각하여 600 \times g에서 20분간 원심분리하였다. 그 후, 상층액을 취하여 분광광도계 (UV-1601PC)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 측정된 값은 mg malondialdehyde/kg meat으로 환산하여 나타냈다.

2.6. 통계 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SPSS software (version 10, 1970)에서 프로그램된 general linear model procedure를 수행하고 유의적인 차이가 보일 때 평균값 간의 차이를 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다 ($p < 0.05$).

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 라디칼 소거능 측정

Fig. 1에는 감마선 조사에 의한 laminarin의 DPPH 라디칼 소거능 측정결과는 제시하였다. Laminarin의 경우 조사하지 않은 상태에서 5.7%의 매우 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으나 조사에 의해 그 활성이 크게 증가하여 50 kGy 처리시 44.2%의 활성을 보였으며 200 kGy의 선량으로 조사되었을 경우 80%이상의 DPPH 라디칼을 소거하는 것으로 확인되었다. 200 kGy이상의 선량에서는 DPPH 라디칼 소거능은 크게 증가하지 않았다. 따라서 200 kGy 이상의 높은 선량은 오랜 기간의 처리시간에 비하여 활성 증가가 효율적이지 못할 것으로 사료된다. β -glucan의 경우에는 50 kGy로 조사되어 저분자화된 경우에 가장 높은 항산화 활성이 보고되었다 [7]. Laminarin과 구조적으로 유사한 β -glucan의 경우에는 방사선 조사에 의하여 β -glucan의 분자량이 감소되어 수용액의 점도가 감소하고 용해도가 증가한다는 결과가 보고되었다 [7]. 또한, β -glucan의 면역활성도 감마선 조사에 의하여 증가한다는 것이 보고되었다 [9,10]. 방사선 조사된 β -glucan을 Fourier transform infrared spectroscopy와 UV-VIS spectrometer로 분석한 결과, 방사선 조사에 의하여 β -glucan

의 다른 기능기들의 변화 없이 glycosidic bond가 절단되어 carbonyl group이나 carboxylic group이 생성되고 이러한 double bond group들이 radical 소거능을 향상시키는 것으로 확인되었다 [7]. Kim *et al.* [11]은 hyaluronic acid에 관한 연구에서 감마선 조사된 저분자량의 hyaluronic acid의 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였으며, 이는 감마선 조사에 의해 새로운 double bond의 형성과 관련이 있다는 결과를 보고하였다. 이러한 선행 연구결과로부터 laminarin의 방사선 조사에 의하여 glycosidic bond가 절단되어 carbonyl이나 carboxyl group이 생성되고, 이러한 double bond들이 라디칼 소거능을 증가시킨 것으로 사료된다.

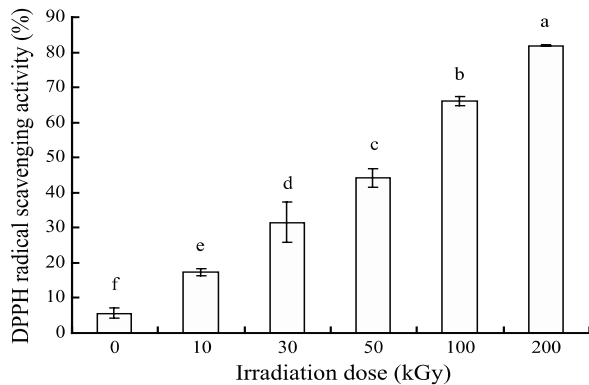


Fig. 1. The DPPH radical scavenging activity of gamma-irradiated laminarin at different doses.

3.2. Reducing power

Ferric reducing antioxidant power 실험법은 노란색의 반응액이 시료에 의해 녹색 또는 파란색으로 바뀌는 정도의 값을 흡광도로 나타내는 방법이다. 즉 반응액에 항산화제 (시료)에 의해 Fe³⁺/ferricyanide 혼합물이 ferrous form으로 환원된다. 따라서 Fe²⁺ 농도의 측정을 700 nm에서 형성된 Perl's Prussian blue가 형성되어 측정되는 원리로 실험에 사용한다 [8].

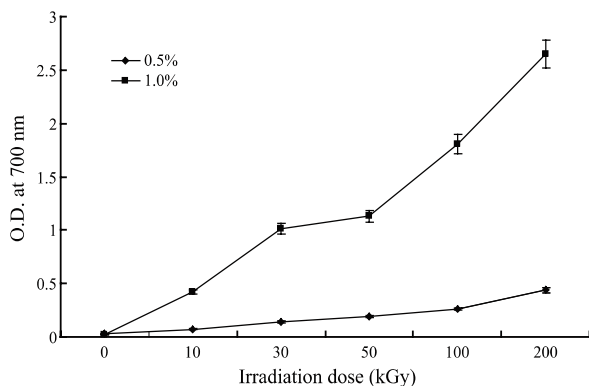


Fig. 2. The reducing power of gamma-irradiated laminarin at different doses.

Fig. 2에는 감마선 조사에 의한 laminarin의 reducing power 측정결과를 제시하였다. 실험 결과 조사선량이 증가함에 따라 농도에 의존적으로 흡광도의 수치가 증가한 것을 확인할

수 있었다. 조사하지 않은 대조구 laminarin의 경우 reducing power는 매우 낮은 값을 가졌으나, 감마선 조사에 의하여 reducing power는 크게 증가한 것이 확인되었다. 이전의 연구에서 reducing power와 DPPH 라디칼 소거능의 결과는 서로 상관관계가 있다고 발표되었다 [11,12]. Kim *et al.* [11]의 결과에서도 DPPH 소거능이 증가된 hyaluronic acid는 높은 reducing power를 나타내었다. 본 실험을 통해 감마선 조사에 의해 분해된 laminarin의 항산화 활성이 증가한 것을 DPPH 라디칼 소거능의 증가와 함께 다시 확인할 수 있었다.

3.3. Rancimat test

감마선 조사에 의한 laminarin의 산화안정성 평가한 결과를 Fig. 3에 제시하였다. Rancimat test는 고온 (130°C 내외)에서 공기를 유지에 불어넣어 산화를 촉진하면 여기서 발생하는 휘발성 물질을 초순수 증류수에 흡수시켜 전기전도도로 산화정도를 측정하는 방법으로 과정이 단순하고 재현성이 있으며 1회에 많은 시료를 처리할 수 있는 장점이 있다 [13]. Rancimat은 유지의 산화안정도가 길수록 높은 값을 가지게 된다. 산화안정도를 평가한 결과, 대조구인 대두유의 산화보호지수 (protection factor, Pf)를 1로 산출하였을 때 모든 시료 처리군이 1 이상으로 나타났으며 조사선량이 증가함에 따라 그 값이 증가하였다. 본 연구에서 감마선 조사되지 않은 laminarin의 경우 대조구의 산화보호지수와 큰 차이를 보이지 않았으나, 감마선 조사 선량에 따라 산화보호지수가 증가되어 200 kGy의 선량으로 조사된 laminarin은 5 이상의 산화보호지수 값을 갖는 것으로 확인되어졌다. 하지만, hyaluronic acid의 이전의 연구 [11]에서는 감마선 조사에 따라 DPPH 소거능과 reducing power는 증가하였으나, 산화보호지수는 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 시나몬, 생강류와 같은 향신료는 유지의 지질산화를 억제하였으나 감마선 조사에 의한 차이는 없다고 보고되었다 [14]. Hyaluronic acid에서는 Cu²⁺나 Fe²⁺와 같은 transition metal들이 hyaluronic acid내의 carboxylic acid와 결합하여 지질 보호의 중요한 역할을 하며, 이러한 transition metal chelation이 방사선 조사에도 일정하게 유지되어 산화보호능이 변하지 않는 것으로 보고되었다. 따라서 방사선 조사된 laminarin의 경우, hyaluronic acid와는 달리 직접적으로 lipid peroxidation에 관여하여 감마선 조사에 의하여 산화보호능이 증가하는 것으로 사료된다.

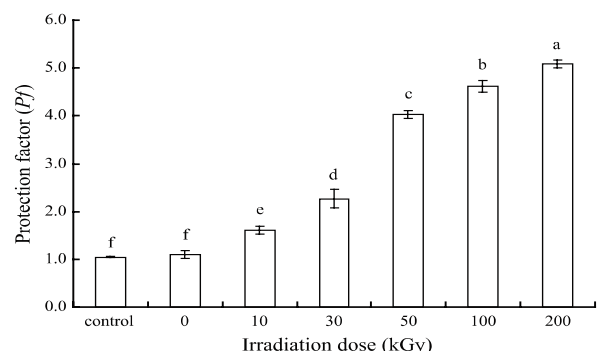


Fig. 3. Protection factor (Pf) of gamma-irradiated laminarin at different doses.

3.4. TBARS measurement

시료의 지질 산화억제 효과를 알아보기 위해 돈육을 이용한 TBARS 법을 이용해 측정하였다 (Fig. 4). 돈육에 시료 및 대조군을 인위적으로 첨가하여 37°C에서 3시간동안 저장하였을 때의 지질산화도를 알아보았으며, 대조군으로는 증류수를 사용하였다. 실험결과 대조군보다 laminarin 첨가구과 돈육의 지질산화를 억제하였음을 알 수 있었다. 또한 이러한 지질산화 억제능은 시간에 따라 확대되어 3시간 저장하였을 때의 결과를 보면 조사선량이 증가함에 따라 돈육의 지질산화가 억제되었음을 확인하였다. 최근 미역에서 추출한 laminarin과 fucoidan을 돈육 패티에 첨가할 경우 지질산화가 억제되고 보수성이 증가하는 것이 보고되었으며, laminarin과 fucoidan의 병용처리는 패티의 미생물도 제어하는 것으로 밝혀졌다 [15]. 따라서 본 연구결과를 통해 감마선 조사한 laminarin은 돈육류의 지질억제를 위한 천연 항산화제로서의 이용가치가 크다고 할 수 있다.

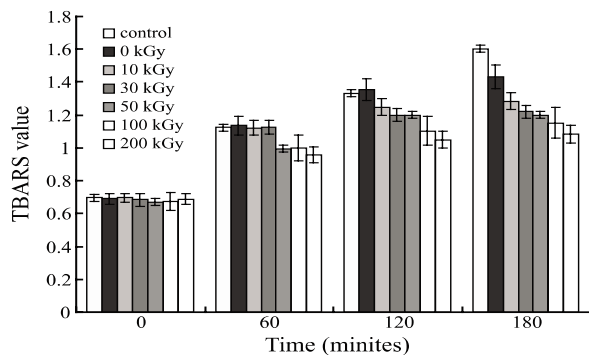


Fig. 4. 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) value of gamma-irradiated laminarin at different doses.

4. 결론

본 연구에서는 감마선 조사에 의하여 분해된 laminarin의 항산화 활성에 관한 연구를 수행하였다. 항산화제의 항산화 활성은 다양한 기작에 의하여 일어나기 때문에, 여러 항산화 활성 측정 방법을 이용하여 감마선 조사된 laminarin의 항산화 활성을 측정하였다. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power, 그리고 lipid peroxidation inhibitory activity 등을 이용하여 감마선 조사된 laminarin의 활성을 측정한 결과, 모든 실험에서 감마선 조사된 laminarin에서 높은 활성을 나타내었으며, 조사된 선량에 비례하여 항산화 활성의 증가가 확인되어졌다. 이러한 결과들은 항산화 활성이 증가된 laminarin의 산업적 생산 방법으로서의 감마선 조사의 활용 가능성을 제시한다.

감사

본 연구는 한국원자력연구원 기본연구사업 연구비 지원에 의

해 수행되었습니다.

References

- Painter, T. (1983) Algal polysaccharides. In G. O. Aspinall (ed), *The Polysaccharides*, pp. 195-285. Academic Press. New York, USA.
- Percival, M. S. and McDowell, R. H. (1967) *Chemistry and Enzymology of Marine Algae Polysaccharides*. pp. 53-71. Academic Press, New York, USA.
- Albersheim, P., A. Darvill, C. Augur, J. J. Cheong, S. Eberhard, M. G. Hahn, V. Marfa, D. Mohnen, M. A. O'Neill, M. D. Sprio, and W. S. York (1992) Oligosaccharins-oligosaccharide regulatory molecules. *Acc. Chem. Res.* 25: 77-83.
- Usui, T., Y. Iwasaki, K. Hayashi, T. Mizunno, M. Tanaka, K. Shingai, and M. Arakawa (1981) Antitumor activity of water soluble β -D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. *Agric. Biol. Chem.* 45: 323-326.
- Kim, J. S., M. S. Heu, and D. M. Yeum (2001) Component characteristics of canned oyster processing waste water as a food resource. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 299-306.
- Oh, H. S., K. T. Kang, H. S. Kim, and M. S. Heu (2007) Food component characteristics of seafood cooking drips. *J. Food Sci. Nutr.* 36: 595-602.
- Byun, E. H., J. H. Kim, N. Y. Sung, J. Choi, S. T. Lim, K. H. Kim, H. S. Yook, M. W. Byun, and J. W. Lee (2008) Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan. *Radiat. Phys. Chem.* 77: 781-786.
- Kim, J. H., N. Y. Sung, S. K. Kwon, P. Srinivasan, B. S. Song, J. Choi, Y. Yoon, J. K. Kim, M. W. Byun, M. R. Kim, and J. W. Lee (2009) γ -irradiation improves the color and antioxidant properties of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract. *J. Med. Food* 12: 1343-1347.
- Kim, J. H., N. Y. Sung, E. H. Byun, S. K. Kwon, B. S. Song, J. Choi, Y. Yoon, J. K. Kim, M. W. Byun, and J. W. Lee (2009) Effect of γ -irradiation on immunological activities of β -glucan. *Food Sci. Biotechnol.* 18: 1305-1309.
- Sung, N. Y., E. H. Byun, S. K. Kwon, B. S. Song, J. Choi, J. H. Kim, M. W. Byun, Y. C. Yoo, and J. W. Lee (2009) Immune-enhancing activities of low molecular weight β -glucan depolymerized by gamma irradiation. *Rad. Phys. Chem.* 78: 433-436.
- Kim, J. K., P. Srinivasan, J. H. Kim, J. Choi, H. J. Park, M. W. Byun, and J. W. Lee (2008) Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid. *Food Chem.* 109: 763-770.
- Ahn, H. J., J. H. Kim, C. Jo, M. J. Kim, and M. W. Byun (2004) Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. *Food Chem.* 88: 173-178.
- Choi, U., D. H. Shin, Y. S. Chang, and J. I. Shin (1992) Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. *Korean J. Food Sci. Nutr.* 33: 1580-1583.
- Murcia, M. A., I. Egea, F. Romojaro, P. Parras, A. M. Jiménez, and M. Martínez-Tomé (2004) Antioxidant evaluation in desert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1872-1881.
- Kim, H. J., J. Choi, J. K. Park, B. S. Song, J. H. Kim, Y. Yoon, C. J. Kim, M. H. Shin, M. W. Byun, and J. W. Lee (2009) Effects of combined treatment of gamma irradiation and addition of fucoidan/laminarin on ready-to-eat pork patty. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 29: 34-39.