

Article

마이크로네시아에 서식하는 해조류 *Pylaiella littoralis* 추출물의 항산화 효과

예보람^{1,2} · 장지이¹ · 권영경^{1,2} · 전선미¹ · 정주영¹ · 강도형¹ · 오철홍¹ · 김지형¹ ·
Abu Affan¹ · 현정호² · 허수진^{1*}

¹한국해양과학기술원 해외생물자원연구센터
(426-744) 경기도 안산시 상록구 해안로 787
²한양대학교 해양환경과학과
(426-791) 경기 안산시 상록구 한양대학로 55

Antioxidant Effect of Tropical Seaweed *Pylaiella littoralis* Extracts Collected from Chuuk Lagoon in Federated States of Micronesia

Bo-Ram Ye^{1,2}, Jiyi Jang¹, Young-Kyung Kwon^{1,2}, Seon-Mi Jeon¹, Joo-Yeong Jeong¹,
Do-Hyung Kang¹, Chulhong Oh¹, Ji Hyung Kim¹, Abu Affan¹,
Jung-Ho Hyun², and Soo-Jin Heo^{1*}

¹Global Bioresources Research Center, KIOST
Ansan P.O Box 29, Seoul 425-600, Korea

²Department of Environmental Marine Sciences, College of Science and Technology
Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

Abstract : *Pylaiella littoralis* was collected in the Chuuk lagoon of the Federated States of Micronesia (FSM). The FSM has a variety of coral reef ecosystems, which provide essential materials, such as minerals, vitamins, essential amino acids, for marine organisms. In this study, the antioxidant activities of ethanol and enzymatic extracts of *P. littoralis* were evaluated by measuring their scavenging activities on DPPH free radical, Alkyl radical, hydroxyl radical and cell viability. The enzymatic extracts were hydrolyzed to prepare water soluble extracts by using five carbohydrate degrading enzymes (AMG, Celluclast, Termamyl, Ultraflo, and Viscozyme) and five proteases (Alcalase, Flavourzyme, Kojizyme, Neutrase, and Protamex). As a result, the enzymatic extracts prepared by Flavourzyme, Ultraflo, and Kojizyme exhibited the greatest effects in DPPH free radical, alkyl radical scavenging activity and cell viability. Also, these enzymatic extracts had a higher antioxidant effect than commercial antioxidants in DPPH free radical and Alkyl radical scavenging activity. This study suggests that *P. littoralis* might be a useful source of natural antioxidants for the development of dietary supplements.

Key words : Federated States of Micronesia, *Pylaiella littoralis*, antioxidant activity, enzymatic extract, radical scavenging activity

1. 서 론

세포 내에서 산소는 전자 운반 과정이나 에너지대사 과

정 중에 부산물인 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)를 형성한다. ROS는 세포 신호 전달 및 면역 반응에 관여하지만 과잉 생산되면 hydroxyl ions, superoxide anions, peroxy radicals과 같은 free radical을 가져 세포의 산화적인 손상을 일으키고 인체 내에서 DNA, RNA, 단백

*Corresponding author. E-mail : sjheo@kiost.ac

질 등에 영향을 미쳐 염증, 쇼크, 노화, 암 등 다양한 질병을 일으킨다고 알려져 있으며(Aruoma 1999; Patel et al. 1999; Reaven and Witzum 1996) ROS 및 이들의 산화적 대사 부산물이 노화와 성인병 질환의 원인으로 작용한다는 연구도 보고된 바 있다(Wiseman 1996).

이러한 현상을 일으키는 ROS를 제어하기 위해 항산화제를 사용하는데, 항산화제는 인체의 산화적인 손상을 줄여줄 뿐 아니라 식품산업에서 식품의 질과 안정성을 향상시키고 지질과산화 방지를 위해 쓰여왔다. 하지만 식품산업에서 주로 쓰이는 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), propylgallate(PG)와 tert-butylhydroquinone(TBHQ)와 같은 합성 항산화제는 인체에 암 발생 및 잠재적인 건강상의 위험 등을 야기시키므로(Grice 1988) 합성 항산화제를 대체할 안전한 천연물 유래 항산화제의 필요성이 대두되고 있다.

마이크로네시아 연방국(Federated States of Micronesia, FSM)은 다양한 산호초 군락을 이루고 있다. 산호초 지역은 무기물, 비타민, 필수아미노산 등 생존에 필요한 물질이 풍부하여(Heidelberg et al. 2004; Johannes et al. 1970) 높은 생물다양성과 높은 생산력을 보이며(권 등 2005) 다양한 종류의 해조류가 서식한다.

해조류는 육상식물에 비해 생육하는 환경이 현저히 다르기 때문에 구성성분이 각기 다르며 다당류를 포함하여 카로테노이드, 식이섬유, 필수 지방산과 비타민, 미네랄 등과 같은 생리활성 물질이 풍부한 것으로 알려져 있다(Mabeau and Fleurence 1993). 또한 특정 해조류에서는 항암, 저혈당증, 항바이러스, 혈관신생억제, 항산화, 항염증 등에 효과가 확인되어(Duan et al. 2006; Heo et al. 2005; Kang et al. 2011; Koyanagi et al. 2003; Kuda et al. 2005; Lamela et al. 1989; Lim et al. 2002; Synytsya et al. 2010; Witvrouw and Clercq 1997) 신약과 건강식품 등으로 이용가치가 있다고 평가되고 있다.

FSM 지역은 우수한 생물다양성을 보임에도 불구하고 해양생물에 대한 연구는 매우 부족한 편이며, 특히 해조류에 대한 기초 및 활용 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 Chuuk lagoon FSM에 서식하고 있는 갈조류인 *Pylaiella littoralis*의 생리활성을 평가하여 천연 항산화제로서의 잠재적인 가능성을 확인하기 위한 것이며, 이를 위해서 용매 및 산업용 가수분해효소를 사용하여 추출물을 제조하였고 이들의 항산화 효과를 라디칼 소거 활성과 세포생존을 검색을 통해 확인해 보았다.

2. 재료 및 방법

시약

단백질 분해효소[Alcalase(A), Flavourzyme(F), Kojizyme

(K), Neutrased(N), Protamex(P)]와 당 분해효소[AMG, Celluclast(C), Termamyl(T), Ultraflo(U), Viscozyme(V)]는 Novo사(Novozymes Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였고 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochloride(AAPH), 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin N-oxide(DMPO), α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-t-butyl nitron(4-POBN), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 분석용 시약을 사용하였다.

재료 및 추출

갈조류인 *P. littoralis*는 FSM의 Chuuk주에 있는 Weno 섬에 위치한 태평양해양연구센터(Korea-South Pacific Ocean Research Center, KSORC) 앞 연안에서 채집하였다. 채집된 *P. littoralis*는 담수로 수 회 세척하고 모래와 염분을 제거하여 동결 건조하였다. 건조된 시료는 분쇄기를 이용해 분말로 제조 후 실험에 사용하였다. 용매추출은 시료 1 g에 80% 에탄올 100 ml를 첨가하여 상온에서 24시간 추출하였다. 그 후 추출물은 여과하고 잔여물을 제거 한 후 농축하여 용매 추출시료로 사용하였다. 효소적 가수분해에 의한 추출물은 Heo et al. (2005)의 방법에 따라 제조하였다. 동결 건조하여 분말화된 시료 1 g을 100 ml의 증류수와 혼합한 후 기질 대 효소의 비율을 100:1의 비율로 당 분해효소(AMG, C, T, U, V)와 단백질분해효소(A, F, K, N, P)를 각각 첨가하였다. 효소적 가수분해 반응물은 24시간 동안 최적의 조건에서 가수분해 시켰다. 효소반응을 통해 추출한 각 추출물은 3,000 xg에서 20분간 원심 분리하여 잔사를 제거하고 상층액을 모아 여과하였다. 추출물은 100°C에서 5분간 가열하여 효소의 활성을 불활성화 시키고 난 후 효소적 추출시료로 사용하였다. 추출물의 농도는 0.5 mg/ml로 적정하여 실험을 수행하였다.

일반성분 분석

*P. littoralis*의 일반성분은 AOAC(1990)의 방법에 따라 수분 함량은 105°C 상압건조법을 이용하였고 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 550°C 건식회화법으로 분석하였으며 탄수화물 함량은 위에 열거한 네 가지 성분들의 합을 백분율의 차로 구하였다. 단당 분석과 아미노산 분석은 한국기초과학지원연구원(Korea Basic Science Institute, KBSI)에 의뢰하여 분석을 수행하였다.

총 Phenolic 함량 측정

에탄올 추출물과 효소적 추출물의 페놀성 화합물 함량은 Shetty et al. (1995)의 방법을 따랐다. 각 추출물 1 ml

에 95% 에탄올 용액 1 ml과 증류수 5 ml을 넣어 혼합한 뒤 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 0.5 ml 넣고 5분간 반응시킨다. 그 후에 5% Na₂CO₃ 용액 1 ml을 넣고 암실보관 후 1시간 동안 반응시킨 후 Spectrophotometer (Shimadzu, UV-160, Japan)을 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각 추출물들의 페놀성 화합물 함량은 gallic acid를 사용하여 작성된 표준 곡선으로부터 구하였다.

DPPH free radical 소거활성 측정

각 추출물의 DPPH free radical 소거활성은 Nanjo et al. (1996)의 방법에 의하여 측정하였다. 60 µl 시료용액에 60 µl DPPH(60 µM) 용액을 첨가하여 암실상태에서 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR spectrometer(JES-FA machine, JOEL, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30 s, filed : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3 s, power : 5 mW, amplitude : 1 × 500의 조건으로 설정하였다. Radical 소거활성(%)은 다음과 같은 수식을 통해 계산하였다.

$$\text{Radical scavenging activity} = [1 - (H_1 / H_0)] \times 100$$

H_1 : 샘플 측정 시 나타나는 시그널 수치

H_0 : 대조군(공시험) 측정 시 나타나는 시그널 수치

Alkyl radical 소거활성 측정

각 추출물의 alkyl radical 소거활성은 Hiramoto et al. (1993)의 방법에 의하여 측정하였다. 20 µl의 시료용액에 증류수, 40 mM AAPH, 40 mM POBN를 각각 20 µl씩 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후, quartz capillary tube에 옮겨 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30 s, filed : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3 s, power : 7 mW, amplitude : 1 × 500의 조건으로 설정하였다. Radical 소거활성(%)은 위와 같은 수식을 통해 계산하였다.

Hydroxyl radical 소거활성 측정

각 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 Rosen and Rauckman (1984)의 방법에 의하여 측정하였다. 20 µl 시료용액에 0.3 M DMPO, 10 mM FeSO₄, 10 mM H₂O₂를 각각 20 µl씩 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮기고 2.5분 후에 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30 s, filed : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3 s, power : 1 mW, amplitude : 1 × 100의 조건으로 설정하였다. Radical 소거활성(%)은 위와 같은 수식을 통해 계산하였다.

세포 생존율 측정

각 추출물의 세포 생존율은 Carmichael et al. (1987)의

방법에 따라 수행하였다. 생존율 측정을 위한 세포는 정상 세포로 알려진 Chinese hamster lung fibroblasts(V79-4 세포)를 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium에 10% Heat-inactivated fetal calf serum, Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin(100 units/ml)이 함유된 배지를 사용하였다. 실험은 V79-4 세포들을 well당 약 2 × 10⁵ 세포수가 되도록 96 well plate에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 부착되도록 하였다. 이 후 에탄올 추출물과 효소적 추출물을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하고 MTT 시약(stock 2 mg/ml)을 50 µl씩 가한 후 4시간 동안 재 배양하였다. 최종적으로 96 well plate를 원심분리하여 상층액을 제거한 후, DMSO를 150 µl씩 가하여 잘 혼합시키고 Spectrophotometer (540 nm)를 이용하여 Optical density를 구하고 이를 세포 생존율을 구하는데 사용하였다.

통계

이 연구에서 실험값은 SPSS package program의 paired t-test로 검정하여 통계 값을 구했으며, 모든 실험값은 평균 ± 표준편차(Mean ± standard deviation)로 나타내었다.

3. 결 과

일반성분

이 연구에 사용된 *P. littoralis*의 일반성분 조성은 Table 1과 같다. 탄수화물 함량이 약 40%로 가장 높았으며 회분

Table 1. Chemical compositions of *Pylaiella littoralis*

	Contents (%)
Moisture	6.03
Ash	26.32
Protein	24.05
Carbohydrate	39.26
Lipid	4.34
Total	100

Table 2. Analysis of carbohydrate component of *Pylaiella littoralis*

Carbohydrate	Contents (%)
L(-)Fucose	4.70
L(-)Rhamnose	21.13
D(+)-Galactose	6.10
D(+)-Glucose	28.99
D(+)-Xylose	39.09
Total	100

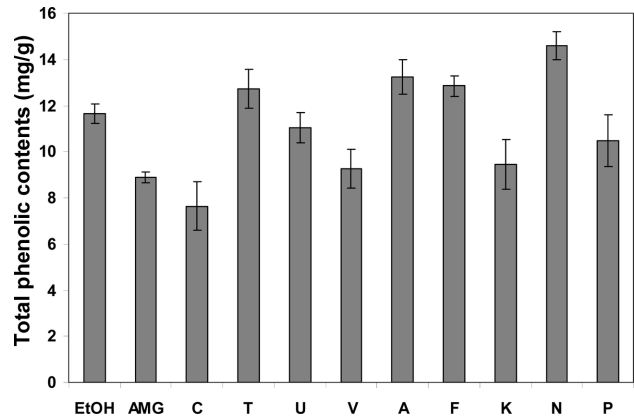
Table 3. Analysis of amino acid component of *Pylaiella littoralis*

Amino acid	Contents (%)
Aspartic acid	1.35
Glutamic acid	17.63
Asparagine	0.26
Serine	2.82
Glycine	4.25
Histidine	0.85
Arginine	1.77
Threonine ^a	3.95
Alanine	25.72
Proline	7.09
Tyrosine	5.26
Valine ^a	9.30
Methionine ^a	0.20
Cysteine	0.07
Isoleucine ^a	8.05
Leucine ^a	5.64
Phenylalanine ^a	0.02
Tryptophan ^a	3.69
Lysine ^a	2.09
Total	100

^aEAA, essential amino acids**Table 4. Analysis of extraction yield of *Pylaiella littoralis***

	Yield (%)
80% Ethanol	28.20
AMG	35.33
Celluclast(C)	43.67
Termamyl(T)	27.67
Ultraflo (U)	24.00
Viscozyme(V)	35.67
Alcalase (A)	27.33
Flavourzyme(F)	31.67
Kojizyme (K)	25.00
Neutrased (N)	32.00
Protamex (P)	26.33

과 단백질 함량은 각각 26%, 24%가 함유되어 있었다. Table 2는 탄수화물을 구성하는 당당 분석 결과를 나타낸 표이다. 당 분석을 한 결과, Xylose가 약 40%로 가장 높게 나타났고, Glucose가 약 29%, Rhamnose가 약 21% 함유되어 있었다. Table 3은 단백질의 아미노산 분석을 나타낸 표로 Alanine이 26%로 제일 높았으며, Glutamic acid는 약 18% 함유되어 있는 것으로 나타났다. 또한 필수아미노산인 Valine, Isoleucine, Leucine은 각각 9.3%, 8.05%,

**Fig. 1. Polyphenolic contents in ethanolic and enzymatic extracts of *Pylaiella littoralis*. EtOH, EtOH extract; AMG, AMG extract; C, Celluclast extract; T, Termamyl extract; U, Ultraflo extract; V, Viscozyme extract; A, Alcalase extract; F, Flavourzyme extract; K, Kojizyme extract; N, Neutrased extract; P, Protamex extract**

5.64%의 비율을 보였다.

추출수율

각 추출물의 수율은 Table 4와 같다. 추출수율은 에탄올 추출물에서는 28.2%의 수율을 보였고 탄수화물분해효소 중에서는 C 추출물에서, 단백질 분해효소 중에서는 N 추출물에서 각각 43.67%, 32%로 가장 높은 추출수율을 나타냈다.

총 Polyphenol 함량

각 추출물의 페놀성 화합물의 함량을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 모든 추출물에서 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며 그 중 효소적 추출물인 N이 14 mg/g으로 가장 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 또한 에탄올 추출물과 비교해보았을 때 효소적 추출물인 T, A, F, N에서 높은 함량을 나타내었다.

Radical 소거활성 평가

*P. littoralis*의 에탄올 추출물과 효소적 추출물의 radical 소거활성을 측정하여 Table 5에 나타내었다. DPPH free radical 소거활성은 모든 추출물들에서 약 67~81%에 가까운 소거활성을 보였다. 그 중 효소적 추출물인 T, F에서 80% 이상의 높은 소거활성을 나타내었고 에탄올 추출물에서는 약 70%의 소거활성을 나타냈다. 또한 상업용 항산화제와 비교해보았을 때 BHA, α -Tocopherol과 유사한 소거활성을 나타내었으며 BHT보다는 높은 소거활성을 나타내었다. Alkyl radical 소거활성은 약 38~70% 범위의 소거활성을 나타내었는데, 그 중 효소적 추출물인 U가 약

Table 5. Radical scavenging activity of ethanolic and enzymatic extracts from *Pylaiella littoralis*

	DPPH radical	Alkyl radical	Hydroxyl radical
80% ethanol	69.39 ± 2.35	54.68 ± 2.89	80.15 ± 3.48
AMG	70.63 ± 1.24	58.76 ± 2.34	4.77 ± 1.58
Celluclast(C)	67.39 ± 1.65	61.25 ± 3.24	9.67 ± 1.69
Termamyl(T)	80.35 ± 1.14	65.78 ± 1.95	7.95 ± 1.51
Ultraflo (U)	78.66 ± 3.06	69.58 ± 2.71	5.54 ± 2.37
Viscozyme(V)	69.62 ± 1.56	62.19 ± 3.42	3.67 ± 1.61
Alcalase(A)	79.61 ± 0.83	58.87 ± 1.86	13.92 ± 3.51
Flavourzyme(F)	81.50 ± 2.49	44.66 ± 3.52	5.87 ± 2.13
Kojizyme(K)	77.92 ± 3.24	43.69 ± 2.63	8.55 ± 1.78
Neutrased(N)	77.38 ± 1.48	38.67 ± 2.68	33.15 ± 2.42
Protamex(P)	78.60 ± 3.05	65.05 ± 3.14	25.44 ± 1.48
BHA	82.24 ± 1.87	24.44 ± 2.49	15.28 ± 1.75
BHT	30.15 ± 1.47	4.01 ± 2.42	17.80 ± 2.08
α-Tocopherol	79.76 ± 1.79	11.33 ± 2.91	24.08 ± 2.57
Ascorbic acid	98.54 ± 1.34	73.37 ± 3.14	91.79 ± 2.41

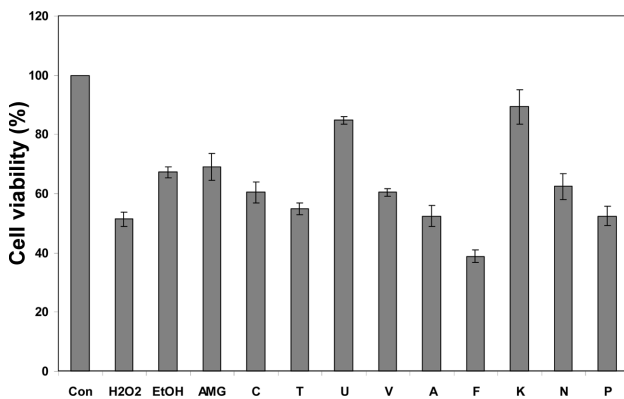


Fig. 2. Cell viability of ethanolic and enzymatic extracts of *Pylaiella littoralis*. EtOH, EtOH extract; AMG, AMG extract; C, Celluclast extract; T, Termamyl extract; U, Ultraflo extract; V, Viscozyme extract; A, Alcalase extract; F, Flavourzyme extract; K, Kojizyme extract; N, Neutrased extract; P, Protamex extract

70%로 가장 높게 나타났다. 또한 효소적 추출물과 에탄올 추출물 모두에서 상용화되고 있는 항산화제인 BHA, BHT, α-Tocopherol 보다 활성이 뛰어났으며 효소적 추출물인 U에서는 Ascorbic acid와 유사한 소거활성능을 갖는 것으로 분석되었다. 따라서 효소적 추출물은 에탄올 추출물보다 DPPH free radical과 Alkyl radical에서 우수한 소거활성을 보였으며, 상업용 항산화제의 radical 소거활성능과 유사하거나 더 높은 효과를 나타내었다. Hydroxyl radical 소거활성은 DPPH free radical이나 alkyl radical과 달리 에탄올 추출물에서 약 80% 이상의 높은 소거활성으로

다른 추출물과 비교하였을 때 높은 소거활성을 나타내었다.

세포 생존율 측정

MTT assay를 통한 세포독성에 대한 세포 생존율을 Fig. 2에 나타내었다. H₂O₂를 처리한 세포의 생존율과 비교해 보았을 때 거의 모든 추출물에서 세포 생존율이 높게 나타났으며 에탄올 추출물은 51.38%의 생존율을 보인 반면 효소적 추출물인 K는 89.33%, U는 84.78%, AMG는 69.9%의 세포 생존율을 보였다. 에탄올 추출물과 비교했을 때 효소 추출물인 K, U, AMG에서 세포독성에 대한 세포 생존율이 더 높다는 것을 확인하였다.

4. 고 찰

갈조류는 탄수화물 성분을 다량 함유하고 있다고 알려져 있는데, 본 연구에서도 *P. littoralis*는 탄수화물 함량이 약 40%로 일반성분 중 가장 많은 함유율을 나타내었다. 추출수율은 에탄올 추출물보다 효소적 추출물이 1.2~2.1 배 정도 더 높았으며 총 페놀성 화합물 함량 또한, 효소적 추출물에서 더 높게 나타남에 따라 에탄올 추출물보다 더 많은 폴리페놀계 생리활성 물질을 포함하는 것으로 사료된다.

Free radical은 생물학적 손상의 주요 요인으로 잘 알려져 있으며 DPPH는 화학적으로 안정화 된 free radical의 형태로 전자나 수소원자와 만나면 환원되어 보라색을 띠는 시약으로 육안으로 쉽게 관찰할 수 있기 때문에 천연 항산화제의 free radical 소거활성을 간단하게 평가하는데

많이 사용된다(Matsukawa et al. 1997). *P. littoralis*의 DPPH free radical의 소거활성은 모든 추출물에서 67~81%에 가까운 소거활성을 보였으며 상용화되고 있는 항산화제와 비슷한 소거능을 나타내었다. 또한 에탄올 추출물 보다 효소적 추출물에서 더 뛰어난 소거활성을 보였는데, 단백질 분해효소 추출물들은 77~81%, 당 분해효소 추출물들은 67~80%의 소거활성을 나타내었고 그 중 단백질 분해효소 추출물인 F에서 81%의 가장 우수한 소거활성을 보임에 따라 단백질 분해효소 추출물에서 상대적으로 radical 소거활성이 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 이것은 단백질 분해효소가 페놀계 화합물의 유효성분의 추출을 향상시키는 능력을 가지고 있기 때문에 단백질 분해효소를 이용한 추출물이 강력한 DPPH radical 소거자로서의 역할을 한다고 보고된 바 있다(Shahidi and Nacz 2004).

Alkyl radical은 2,2'-azobis(2-aminopropane)dihydrochloride (AAPH)에 의해 발생하는데, 많은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 형성된다고(Hiramoto et al. 1993) 알려져 있다. Alkyl radical 소거활성에서는 효소 추출물인 U가 약 70%에 달하는 소거활성을 보였으며 다른 효소적 추출물들도 상용되고 있는 항산화제보다 비슷하거나 더 뛰어난 소거활성을 확인하였다. 이것은 가수분해에 의해 고분자 물질이 분해되면서 항산화 활성을 높여준다고 보고됨에 따라(Siriwardhana et al. 2008) DPPH free radical과 Alkyl radical의 소거활성에서 효소적 추출물의 소거활성은 에탄올 추출물에서보다 더 높게 나타났다고 사료된다. Hydroxyl radical은 H_2O_2 와 redox-active transition metal인 Fe^{2+} 또는 Cu^{2+} 와 관련이 있는 Fenton 반응에 의해 일어나며(Huang et al. 2002), 매우 높은 반응성을 띄어 살아있는 세포와 반응하여 손상을 입히고 지질 과산화물을 일으킨다고 보고된 바 있다(Halliwell and Gutteridge 1984; Koppenol and Liebman 1984). Hydroxyl radical 소거활성은 에탄올 추출물에서 약 80% 이상의 높은 소거활성으로 효소적 추출물보다 높은 소거율을 나타냈다. 이전 연구에서는 vitamin C의 hydroxyl radical 소거활성이 1.63 mg/ml에서 50.0~60.0%의 소거활성을 보인 반면(Xing et al. 2005), *P. littoralis*의 에탄올 추출물은 저 농도인 0.5 mg/ml에서 80.15%의 소거활성을 가짐에 따라 vitamin C보다 소거활성이 더 뛰어남을 확인하였다. 하지만 DPPH free radical과 Alkyl radical의 결과와는 달리 hydroxyl radical 소거활성은 에탄올 추출물에서 높게 나타났는데, 이것은 식물의 종류와 추출방법에 따라 항산화 활성이 다르게 나타남(Kim et al. 2008)에 따라 에탄올 추출물과 효소적 추출물에서 다양한 radical 소거활성의 결과가 나온 것이라 사료된다. 추출물들의 세포 독성을 확인하기 위한 방법으로 추출물들의 세포 생존율을 MTT

assay를 통해 확인한 결과, 에탄올 추출물보다 효소적 추출물인 AMG, U, K에서 세포생존율이 더 높게 나타났다. 그 중 효소적 추출물인 K는 약 90%의 생존율을 보였다. 이것은 Heo et al. (2005)에 따르면 유기용매 추출방법과 비교하였을 때, 효소적 추출방법은 높은 추출수율과 높은 radical 소거활성을 가지며 수용성이기 때문에 더 안전하다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 모든 추출물에서 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며 에탄올 추출물과 비교해 보았을 때, 효소적 추출물에서 높은 추출수율과 페놀성 화합물 함량을 보였다. 또한 효소적 추출물은 DPPH radical과 alkyl radical에서도 우수한 소거활성을 보였으며 높은 세포 생존율을 나타냈다. 이것은 효소적 가수분해에 의한 수용성 추출물이 다양한 생리활성물질을 포함하고 있기 때문에 다양한 활성물질의 영향을 받아 우수한 소거활성과 높은 세포 생존율을 보였다고 사료된다. 그러므로 이번 연구를 통해 *Pyraliella littoralis*는 천연 항산화제로서의 이용 가능성이 있다고 판단된다.

이전 연구에 따르면 radical 소거활성과 페놀성 화합물이 직접적인 상관관계가 있다고 보고하였고(Oki et al. 2002) 높은 폴리페놀 함량을 보인 샘플에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다고 보고하고 있다(하 등 2006). 하지만 이 연구에서는 가장 높은 페놀성 화합물을 함유한 효소적 추출물인 N에서 높은 radical 소거활성을 나타내지 않았으며, 상용화 되고 있는 항산화제에 비해 뛰어난 소거활성도 나타내지 않았다. 또한 추출수율이 높은 감태에서 가장 우수한 항산화 활성이 나타났다는 보고(Heo et al. 2005)가 있었지만 이 연구에서는 높은 페놀성 화합물 함량을 가지는 효소적 추출물의 추출수율은 상대적으로 다른 추출물보다 낮게 나타났으며 alkyl radical에서 우수한 활성을 나타낸 추출물 U도 다른 추출물들에 비해 낮았다. 이것은 식물의 종류와 서식환경에 따라 만들어지는 생리활성 물질이 다르기 때문이라 여겨지며, *P. littoralis*의 높은 추출수율을 나타내는 효소적 추출물들은 폴리페놀 화합물 외에 다른 생리활성 물질들을 포함하고 있는 것으로 사료된다. Lee et al. (1996)에 따르면 갈조류인 *Ecklonia stolonifera*의 분획별 항산화 효과를 탐색한 결과 ethyl acetate와 dichloromethane 분획에서 DPPH free radical 소거활성에 뛰어난 효과를 나타내었고, *Ecklonia cava*에서는 phlorotannins의 구조와 특성에 따라 항산화 활성이 달라짐을 확인하였다(Li et al. 2009). 또한 16종의 해조류에서 diethyl ether 추출을 하여 측정한 결과 항산화 효과가 강할수록 불포화지방산이 높게 나오므로써 해조류에 함유된 항산화 물질과 불포화지방산이 관련성이 있다고 보고 하였다(Haung and Wang 2004). 그러므로 이번 실험에서 사용했던 *P. littoralis*의 추출물들을 대상으로 극

성별 및 분자량별 분획에 따른 항산화 효과를 검색할 필요가 있으며, 항산화 활성 이외 다양한 생리활성에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 본다.

사 사

이 연구는 한국해양과학기술원(Korea Institute of Ocean Science and Technology, KIOST)의 기본연구사업인 ‘조류를 이용한 바이오에너지 자원화 기술개발(PE98751)’과 ‘열대 태평양기후 운영 및 기본연구활동 지원(PE98785)’ 과제의 지원으로 이루어졌으며, 이에 깊은 감사를 표합니다. 또한 KIOST 조류바이오연료연구실(Algae Biofuels Lab.)과 태평양해양연구센터(KSORC)의 연구자 및 학생들의 도움과 노력에 깊은 감사 드립니다.

참고문헌

- 권문상, 노재훈, 이미진 (2005) 남태평양 해양의 잠재력과 우리나라의 새로운 연구개발 투자 분야에 대한 고찰. *Ocean and Polar Res* **27**(4):419-431
- 하태열, 강성호, 권태연, 안지윤, 김성란, 김동수 (2006) 극지 미세조류의 유용성분 함량 및 항산화 활성. *Ocean and Polar Res* **28**(1):37-43
- AOAC. (1990) Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th eds), Washington D.C
- Aruoma OI (1999) Antioxidant action of plant foods: Use of oxidative DNA damage, as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radical Res* **30**(6):419-427
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**(4):936-941
- Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG (2006) Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem* **95**(1):37-43
- Grice HC (1988) Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol* **26**(8):717-723
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**(1): 1-14
- Huang HL, Wang BG (2004) Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. *J Agr Food Chem* **52**(16):4993-4997
- Heidelberg KB, Sebens KP, Purcell JE (2004) Composition and sources of near reef zooplankton on a Jamaican foreereef along with implications for coral feeding. *Coral Reefs* **23**(2):263-276
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ (2005) Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technol* **96**(14):1613-1623
- Hiramoto K, Johkoh H, Sako K, Kikugawa K (1993) DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radical Res* **19**(5):323-332
- Huang X, Dai J, Fournier J, Ali AM, Zhang Q, Frenkel K (2002) Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Bio Med* **32**(1):84-92
- Johannes RE, Coles SL, Kuenzel NT (1970) The role of zooplankton in the nutrition of some scleractinian corals. *Limnol Oceanogr* **15**(4):579-586
- Kang SM, Kim KN, Lee SH, Anh G, Cha SH, Kim AD, Yang XD, Kang MC, Jeon YJ (2011) Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydr Polym* **85**(1):80-85
- Kim YA, Kong CS, Um YR, Lee JI, Nam TJ, Seo Y (2008) Antioxidant Efficacy of Extracts from a Variety of Seaweeds in a Cellular System. *Ocean Science J* **43**(1):31-37
- Koppenol WH, Liebman JF (1984) The oxidizing nature of the hydroxyl radical. A comparison with the ferryl ion (FeO^{2+}). *J Phys Chem* **88**(1):99-101
- Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Soeda S, Shimeno H (2003) Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem Pharmacol* **65**(2):173-179
- Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y (2005) Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J Food Compos Anal* **18**(7):625-633
- Lamela M, Anca J, Villar R, Otero J, Calleja JM (1989) Hypoglycemic activity op several seaweed extracts. *J Ethnopharmacol* **27**(1-2):35-43
- Lee JH, Park JC, Choi JS (1996) The Antioxidant Activity of *Ecklonia stolonifera*. *Arch Pharm Res* **19**(3):223-227
- Li Y, Qian ZJ, Ryu BM, Lee SH, Kim MM, Kim SK (2009) Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorgan Med Chem* **17**(5):1963-1973
- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO (2002) Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agr Food Chem* **50**(13):3862-3866

- Mabeau S, Fleurence J (1993) Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Tech* **4**(4):103-107
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J App Phys* **9**(1):29-35
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Bio Med* **21**(6):895-902
- Oki T, Masuda M, Furuta S, Nishibia Y, Terahara N, Suda I (2002) Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J Food Sci* **67**(5):1752-1756
- Patel RP, Cornwell T, Darley-USMAR, VM (1999) The biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite : Implications for mitochondrial function. In: Cadenas E, Packer L (ed) *Understanding the Process of Ageing: The roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants*. Academic Press, New York, pp 39-40
- Reaven PD, Witzum JL (1996) Oxidised LDL in atherogenesis: Role of dietary modification. *Annu Rev Nutr* **16**(1):51-71
- Rosen GM, Rauckman EJ (1984) Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In: Packer L (ed) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, pp 198-209
- Shahidi F, Naczki M (2004) Antioxidant properties of food phenolics. In : Shahidi F, Naczki M (eds) *Phenolics in food and nutraceuticals*. FL:CRC Press, Boca Raton, pp 403-437
- Shetty K, Curtis OF, Levin RE, Witkowsky R, Ang W (1995) Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *J Plant Physiol* **147**(3-4):447-451
- Synsytysya A, Kim WJ, Kim SM, Pohl R, Syntsya A, Kvasnička F, Čopíková J, Park YII (2010) Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean Brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr Polym* **81**(1):41-48
- Siriwardhana N, Kim KN, Lee KW, Kim SH, Ha JH, Song CB, et al (2008) Optimisation of hydrophilic antioxidant extraction from *Hizikia fusiformis* by integrating treatments of enzymes, heat and pH control. *Int J Food Sci Tech* **43**(4):589-596
- Wiseman H (1996) Dietary influences on membrane function; important in protection against oxidative damage and disease. *J Nutr Biochem* **7**(1):2-15
- Witvrouw M, Clercq ED (1997) Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs. *Gen Pharmacol* **29**(4):497-511
- Xing R, Yu H, Liu S, Zhang W, Zhang Q, Li Z, Li P (2005) Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. *Bioorgan Med Chem* **13**(4): 1387-1392

Received Aug. 3, 2012

Revised Sep. 10, 2012

Accepted Sep. 11, 2012