

## 감태(*Ecklonia cava*) 줄기 및 잎의 효소적 추출물과 메탄올 추출물에 의한 항산화 활성비교

이승홍·김길남·차선희·안긴내·전유진<sup>†</sup>

제주대학교 해양생물공학과

### Comparison of Antioxidant Activities of Enzymatic and Methanolic Extracts from *Ecklonia cava* Stem and Leaf

SeungHong Lee, KilNam Kim, SeonHeui Cha, GinNae Ahn and YouJin Jeon<sup>†</sup>

Faculty of Applied Marine Biotechnology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

In this study, antioxidant activities of enzymatic and methanolic extracts from *E. cava* stem and leaf were evaluated by measuring the scavenging activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl radical, hydrogen peroxide and the inhibitory effects on DNA damage induced by oxidative stress of cells. Enzymatic extracts were prepared by enzymatic hydrolysis of both stem and leaf using food grade five different carbohydrases (Viscozyme, Celluclast, AMG, Termamyl, Ultraflo) and five proteases (Protamex, Kojizyme, Neutrase, Flavourzyme, Alcalase). The enzymatic extracts were lower than methanolic extracts in polyphenol contents, but higher in extraction yield by approximately 30%. The enzymatic extracts were superior to methanolic extracts in DPPH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activities and DNA damage protective effect. There were no significant antioxidant activity difference between stem and leaf, but the extracts of leaf were relatively better than those of stem. In this study it is suggested that *E. cava* stem as well as its leaf would be a good raw materials for antioxidants compound extraction and enzymatic hydrolysis would be a good strategy to prepare antioxidant extracts from seaweeds.

**Key words:** *Ecklonia cava*, antioxidant, enzymatic extract, DNA damage, radical scavenging

#### 서 론

최근 노화와 성인병 질환의 원인으로 생체 내에서 발생하는 hydroxyl radical(OH), superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의한 산화적 대사 부산물이 중요한 원인이 된다는 학설이 있으며(1), 이들 ROS는 세포막 지방질을 과산화시키고 세포막투과성의 변화를 초래하여 DNA 손상을 유발시킨다고 보고되어 있다(2). 이러한 활성산소는 정상적인 세포 대사과정에서도 일부 생성되고 있으며, 체내에서는 각종 항산화효소와 항산화물질로 이를 제어하고 있다(3). 따라서 이러한 활성산소를 효과적으로 제어시키는 안전하고 경제적인 천연물의 생리활성 물질을 이용한 많은 연구가 진행되고 있다.

제주도는 사면이 바다라는 지리적인 조건과 구로시오계의 난류와 황해의 저층 냉수, 황해와 남해의 연안수 등 담수계가 교류하는 곳이라서 해산식물의 보고라고 할만큼 다양한 종류의 해조류가 풍부하게 서식하고 있다(4). 해조류는

육상식물에 비해 생육하는 환경이 현저한 차이가 있어 구성 성분이 다르며, 풍부한 다당류를 함유하고 있을 뿐만 아니라 다양한 미네랄과 비타민이 풍부하게 함유되어 있고, 어떤 특정 성분에서는 항균, 항산화, 항바이러스, 항암활성을 비롯하여 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 협심증, 뇌졸중 등의 성인병 예방에 효과적이라는 보고들을 통해 다양한 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다(5-8). 이중 감태(*Ecklonia cava*)의 polyphenol인 phlorotannin은 식품으로서 뿐만 아니라 항산화성, 항암성, 항고혈압성 등 여러 가지 기능성들이 밝혀짐으로써 새로운 기능성 소재로서 충분한 가치가 있음이 보고되었다(9-13). 그러나 현재까지 연구되어진 감태의 생리활성 물질은 주로 잎 추출물에 의한 것으로서 감태의 줄기와 잎의 성분의 차이와 이에 따른 생리활성 효과는 어떠한 차이가 있는지에 대한 연구는 찾아보기 힘들다. 이에 본 연구에서는 감태의 줄기와 잎을 따로 분리하여 얻어진 추출물로부터의 항산화효과를 검색하여 잎의 추출물과 비교하여 줄기 추출물의 생리활성 효과를 알아보았다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: youjinj@cheju.ac.kr  
Phone: 82-64-754-3475, Fax: 82-64-756-3493

## 재료 및 방법

### 시약

단백질 분해효소(Protamex, Kojizyme, Neutrase, Flavourzyme, Alcalase)와 당 분해효소(Viscozyme, Celluclast, AMG, Termamyl, Ultraflo)는 Novo사(Novozymes Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하여 사용하였고, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2-deoxyribose, peroxidase, ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid), thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid (TCA)는 Sigma 회사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

### 감태

본 실험에 사용된 감태(*Ecklonia cava*)는 제주도 표선 연안에 서식하고 있는 갈조류로 2005년 8월~10월 사이에 채집한 후 흐르는 물로 수세하여 염분과 협잡물을 제거하고, 잎과 줄기 부분을 따로 분리하여 동결 건조하여 사용하였다.

### 일반성분 분석

감태 줄기와 잎의 일반성분은 AOAC법(14)에 따라 수분 함량은 105°C 상압건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 550°C 건식회화법으로 분석하였으며, 탄수화물 함량은 고행분의 총량에서 수분, 회분, 조단백질 그리고 조지방의 함량을 뺀 값으로 나타내었다.

### 메탄올 추출물의 조제

동결 건조한 감태 줄기와 잎을 곱게 갈아 각각 1 g을 취한 후 70% 메탄올 100 mL에 혼합하여 상온의 shaking incubator에서 24시간동안 추출한 후 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거한 상층액을 취하였다. 상층액을 감압여과하고 농도를 2 mg/mL로 맞추어 이를 메탄올 추출 시료로 사용하였다.

### 효소적 추출물의 조제

효소적 추출은 Heo 등(15)의 방법으로 Table 1의 조건에 따라 가수분해를 하였다. 동결 건조 후 곱게 간 감태 줄기와 잎 1 g을 각각 100 mL의 증류수와 혼합한 후 100 µL의 단백

질 분해효소와 당 분해효소를 첨가하였다. 효소적 가수분해 반응물은 24시간동안 최적의 조건에서 효소반응을 통해 추출한 후 각 추출물을 3,000×g에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거한 상층액을 취한 후 여과하여 농도를 2 mg/mL로 맞추어 이를 효소적 추출 시료로 사용하였다.

### 추출물의 수율 측정

수율은 감태 줄기, 잎으로부터 유효성분을 제조방법에 따라 획득한 다음 양을 %로 계산하였다.

### 총 polyphenol 함량 측정

감태 줄기와 잎의 총 polyphenol 함량 측정은 Shetty 등(16)에 준하여 수행하였다. 각 추출물 1 mL에 95% 에탄올 용액 1 mL와 증류수 5 mL를 넣어 혼합한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma Chemical, St. Louis, MO) 0.5 mL를 넣고 5분간 반응시켰다. 여기에 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1 mL를 가한 후 어두운 상태에서 1시간 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 표준물질로 gallic acid를 사용하여 동일한 방법으로 작성된 표준 곡선으로부터 총 polyphenol 함량으로 환산하였다.

### DPPH free radical 소거활성 측정

각 추출물의 free radical 소거활성은 Blois(17)의 방법을 변형하여 측정하였다. 에탄올에 용해시킨 4×10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 2.9 mL에 각 추출물 0.1 mL를 넣고 혼합하여 30분간 반응시킨 후 516 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH free radical 소거활성(\%)} = [1 - (\text{대조구흡광도} - \text{시료흡광도}) / \text{대조구흡광도}] \times 100$$

### Hydroxyl radical 소거활성 측정

각 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 2-deoxyribose oxidation 방법(18)을 변형하여 측정하였다. Hydroxyl radical은 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 존재하에서 Fenton 반응으로 생성시켰다. 반응용액은 10 mM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 용액, 10 mM EDTA 용액과 10 mM 2-deoxyribose 용액을 각각 200 µL를 첨가한 후 각 추출물 200 µL와 0.1 M phosphate buffer 용액(pH 7.4) 1 mL를 넣어 혼합시킨 후 총 부피가 1.8 mL가 되도록

Table 1. Optimum hydrolytic conditions of particular enzymes

Enzyme	Optimum conditions		Enzyme characteristics
	pH	Temperature (°C)	
Viscozyme	4.5	50	Arabanase, cellulase, β-glucanase, hemi-cellulase and xylianase
Celluclast	4.5	50	Catalyzing the breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose polymer
AMG	4.5	60	An exo-1,4-α-d-glucosidase
Termamyl	6.0	60	A heat-stable α-amylase
Ultraflo	7.0	60	A heat-stable multi-active β-glucanase
Protamex	6.0	40	Hydrolysis of food proteins
Kojizyme	6.0	40	Boosting of the soya sauce fermentation
Neutrase	6.0	50	An endoprotease
Flavourzyme	7.0	50	Containing both endoprotease and exopeptidase activities
Alcalase	8.0	50	A endo protease

조제하였다. 반응용액에 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µL를 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응을 시킨 후 2.8% trichloroacetic acid와 thiobarbituric acid를 각각 1 mL씩 첨가시키고, 100°C 끓는 물에 10분간 발색시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl radical 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거활성(\%)} = [1 - (\text{대조구흡광도} - \text{시료흡광도}) / \text{대조구흡광도}] \times 100$$

Hydrogen peroxide 소거활성 측정

각 추출물의 hydrogen peroxide 소거활성은 Müller의 방법(19)에 따라 수행하였다. 0.1 M phosphate buffer(pH 5.0)와 각 추출물 100 µL를 각각 96 microwell plate에 넣어 혼합시킨다. 여기에 다시 20 µL의 hydrogen peroxide를 첨가시키고 37°C에서 5분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 1.25 mM ABTS와 peroxidase(1 unit/mL)를 각각 30 µL 첨가하여 최종적으로 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide 소거활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide 소거활성(\%)} = [1 - (\text{대조구흡광도} - \text{시료흡광도}) / \text{대조구흡광도}] \times 100$$

Alkaline comet assay를 이용한 DNA 손상 억제활성 측정

Comet assay를 실시하기 전에 시료의 전처리과정으로 배양된 mouse lymphoma cell(L5178Y-R)에 각 추출물(50 µL)을 처리하여 37°C에서 30분동안 배양한 후 산화스트레스에 의한 DNA 손상을 유발시키기 위해 50 µM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µL)를 처리하였다. 빙냉하에서 5분 동안 반응시킨 다음, 2,000×g에서 3분간 원심분리한 후 얻은 세포를 PBS로 세척시켰다.

위의 일련의 과정을 마친 세포의 DNA 손상을 측정하기 위해 이용한 alkaline comet assay는 Singh 등(20)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. 1% normal melting agarose (NMA)가 pre-coating된 fully frosted slide 위로 세포와 75 µL의 0.7% low melting agarose gel(LMA)의 현탁액을 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮었다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µL로 한 겹 더 덮은 후, lysis 과정을 거쳤다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris와 1% sodium laurylsarcosine; 1% Triton X-100)에 slide를 담가 4°C 저온 암실에서 1시간 동안 침지시켰다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고, 4°C의 차가운 완충액(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13.0)을 채워 unwinding 시켰다. 40분이 지난 후 25 V/300 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충액(pH 7.5)으로 충분히 세척한 후 에탄올을 5분간 처리하였다.

Comet image 분석을 위해 20 µg/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경(Leica DMLB, Germany)에서 관찰하고 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터(Kinetic Imaging, Komet 5.0, UK) 상에서 분석하였다. DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA %를 곱해준 tail moment(TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 처리구 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개의 세포를 관찰하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상 및 각 추출물에 의한 DNA 손상 억제정도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DNA damage inhibition activity (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

A: DNA tail percentage of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells  
 B: DNA tail percentage of sample-treated cells

결과 및 고찰

일반성분

본 실험에 사용한 감태 줄기와 잎의 일반성분 조성은 Table 2와 같다. 줄기와 잎의 탄수화물 함량이 전체의 약 60%를 차지하였다. 여러 해조류들 중에 갈조류는 다당류를 비롯한 탄수화물 성분을 다량으로 함유하고 있다고 알려져 있는데, 본 실험에서 또한 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것을 확인하였다. 수분과 회분 함량은 잎에 비해 줄기가 각각 10.8%, 20.5%로 두 배 정도 높았으며, 단백질, 지방 함량은 잎이 각각 14.1%, 2.5%로 줄기에 비해 높은 결과를 보였다.

추출수율

각 추출물의 유효성분 즉, 수율은 Table 3과 같다. 효소적 추출물은 잎과 줄기 모두 50% 이상의 높은 수율을 보였고, 메탄올 추출물에서는 잎 21%, 줄기 31%로 효소적 추출물보다는 낮은 수율을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 효소적 추출물이 메탄올 추출물보다 많은 생리활성물질이 포함되어 있을 것이라 사료된다. Heo 등(15)의 연구에서도 추출수율이 높은 감태에서 가장 우수한 항산화활성이 나타났다고

Table 2. Chemical compositions of *E. cava* stem and leaf (%)

	Stem	Leaf
Moisture	10.81 ± 0.3 <sup>1)</sup>	5.68 ± 0.3
Ash	20.52 ± 0.4 (23.05 ± 0.5) <sup>2)</sup>	11.53 ± 0.1 (12.26 ± 0.4)
Protein	7.71 ± 0.4 (8.66 ± 0.2)	14.15 ± 0.2 (15.05 ± 0.5)
Carbohydrate	59.49 ± 0.3 (66.84 ± 0.1)	66.22 ± 0.2 (70.44 ± 0.2)
Lipid	1.56 ± 0.1 (1.75 ± 0.3)	2.56 ± 0.1 (2.72 ± 0.1)

<sup>1)</sup>The values are averages of triplicate determinations.  
<sup>2)</sup>Values in dry basis.

**Table 3. Yield of extracts from *E. cava* stem and leaf (%)**

Ingredient		Stem	Leaf
Carbohydrases	Termamyl	56.33±0.2 <sup>1)</sup>	59.33±0.2
	Viscozyme	49.00±0.4	50.67±0.5
	AMG	59.33±0.1	62.00±0.3
	Celluclast	58.33±0.2	53.67±0.3
	Ultraflo	58.00±0.7	63.67±0.4
Proteases	Kojizyme	63.33±0.3	53.33±0.2
	Neutrase	60.33±0.5	56.00±0.2
	Flavourzyme	63.00±0.3	61.33±0.1
	Protamex	61.33±0.4	56.33±0.4
	Alcalase	55.67±0.1	53.33±0.3
Methanolic extract		31.33±0.4	21.00±0.1

<sup>1)</sup>The values are averages of triplicate determinations.

보고되었다.

**총 polyphenol 함량**

페놀성 물질은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며, 항산화효과 등의 생리활성 기능도 가진다(21). 일반적으로 페놀성 화합물이 항산화작용을 하는 대표적인 물질로 보고되어 있어 감태 줄기와 잎의 각 추출물에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 측정하였다. 각 추출물의 페놀성 화합물 함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 모든 추출물에서 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 그 중 70% 메탄올 잎 추출물이 3,545 mg/100 g으로 가장 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있다. 줄기와 잎의 페놀성 화합물 함량을 비교한 결과 모든 추출물에서 잎이 줄기보다 많은 페놀성 화합물을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

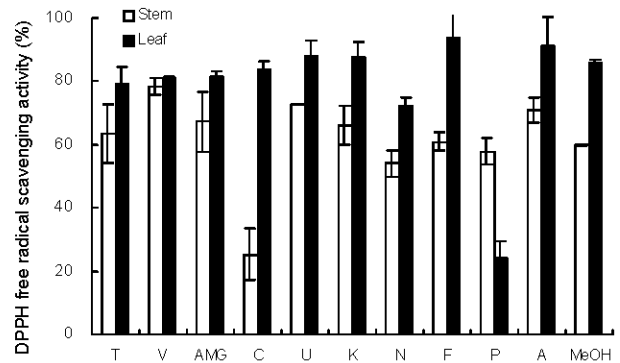
**DPPH free radical 소거활성**

Free radical은 생물학적 손상의 주요 요인으로 잘 알려져 있는데, DPPH는 천연 항산화제의 free radical 소거활성을 평가하는데 일반적으로 사용된다(22). 따라서 감태 줄기와

**Table 4. Polyphenolic contents in enzymatic and methanolic extracts of *E. cava* stem and leaf (mg/100 g)**

Ingredient		Stem	Leaf
Carbohydrases	Termamyl	1418±0.3 <sup>1)</sup>	1797±0.1
	Viscozyme	1513±0.1	1966±0.1
	AMG	1492±0.3	1734±0.4
	Celluclast	1429±0.3	1966±0.5
	Ultraflo	1450±0.1	2029±0.1
Proteases	Kojizyme	1450±0.1	1945±0.2
	Neutrase	1418±0.2	2018±0.3
	Flavourzyme	1408±0.1	1945±0.1
	Protamex	1461±0.2	1892±0.3
	Alcalase	1482±0.2	1966±0.2
Methanolic extract		1872±0.1	3545±0.6

<sup>1)</sup>Mean±SE of determinations was made in duplicate experiments.



**Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of enzymatic and methanolic extracts from *E. cava* stem and leaf (2 mg/mL).**

T: Termamyl ext, V: Viscozyme ext, AMG: AMG ext, C: Celluclast ext, U: Ultraflo ext, K: Kojizyme ext, N: Neutrase ext, F: Flavourzyme ext, P: Protamex ext, A: Alcalase ext, MeOH: Methanol ext. Mean±SE of determinations was made in duplicate experiments.

잎의 각 추출물별로 DPPH free radical 소거 능력을 측정 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 잎의 각 추출물은 약 60~90%의 우수한 소거활성을 보였으며, 이 중 잎의 Alcalase 추출물과 Flavourzyme 추출물에서 90%의 소거활성으로 가장 높은 소거활성을 보였다. 이에 비해 줄기의 각 추출물은 잎 추출물보다는 낮은 약 50~70%의 소거활성을 보였으나, 이 수치는 Heo 등(23)의 결과에서 보고된 상용되어지고 있는 항산화제와 비슷한 소거율로서 잎과 마찬가지로 줄기 또한 뛰어난 항산화효과를 가지고 있는 것으로 보여진다. DPPH free radical에 대해서는 많은 연구들이 페놀성 화합물과의 긍정적 상관관계를 보고한 바 있다(24,25). 본 연구에서도 DPPH free radical과 페놀성 화합물과의 상관관계를 비교해 본 결과, DPPH free radical 소거활성이 높게 나타났던 추출물뿐만 아니라 낮은 활성을 나타내었던 추출물까지도 높은 페놀 함량을 나타낸 것을 확인하였다. 이는 효소적 가수분해 방법에 의해 얻어진 추출물에 페놀성분 뿐만 아니라 다른 활성성분들이 항산화효과에 영향을 끼친 것으로 사료된다. 감태 잎의 메탄올 추출물은 페놀성 화합물이 높은 함량에도 불구하고 DPPH free radical 소거활성이 낮게 나타났는데, 이러한 결과는 감태의 효소적 추출물의 유효성을 입증하는 것이다.

**Hydroxyl radical 소거활성**

Fenton 반응에 의해서 생성된 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, DPPH free radical 소거활성에 대한 결과와는 달리 줄기와 잎의 메탄올 추출물이 각각 75.76%와 75.53%로 가장 우수한 hydroxyl radical 소거활성을 보였으며, 효소적 추출물에 비해 3배 이상의 높은 소거활성을 보였다. 효소적 추출물인 경우 잎과 줄기에서 모두 30% 미만의 낮은 소거활성을 나타내었으며, 줄기 추출물이 잎 추출물보다 약간 높은 소거활성을 보였지만 유의적

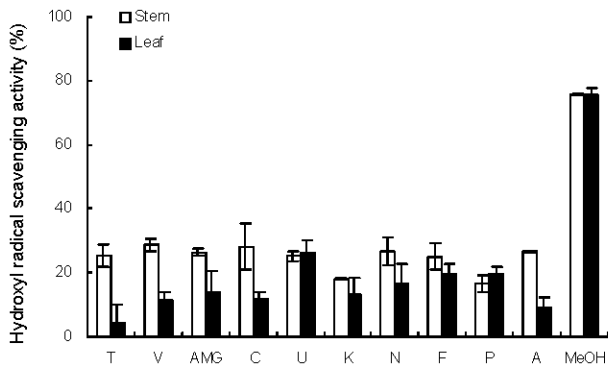


Fig. 2. Hydroxyl radical scavenging activity of enzymatic and methanolic extracts from *E. cava* stem and leaf (2 mg/mL).

Abbreviations are the same as in Fig. 1. Mean±SE of determinations was made in duplicate experiments.

인 큰 차이는 없었으며, Heo 등(23)의 보고와 비교하여 유사한 결과를 보였다. Kim 등(26)은 항산화성의 정도는 식물의 종류 및 이들에 함유되어 있는 항산화 유효성분의 종류와 추출방법에 따라 현저한 차이가 난다고 보고하였다.

Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide는 체내 각 기관들의 DNA에 심각한 손상을 초래해 각종 질병과 노화를 유발한다고 알려져 있다 (27). 이러한 hydrogen peroxide 소거활성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 모든 추출물에서 약 60~80%의 우수한 소거활성이 나타났으며, 잎 추출물이 줄기 추출물보다 다소 높은 소거활성을 보였다. 메탄올 추출물에서도 줄기는 약 70%, 잎은 약 60%의 비교적 높은 hydrogen peroxide 소거활성을 보였으나 대부분의 효소적 추출물의 활성이 메탄올 추출물보다 높게 나타났다. 따라서 우수한 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내는 모든 줄기, 잎 추출물을 가지고 뒤에 추가실험을 통해 DNA 손상 억제활성을 확인해 보았다.

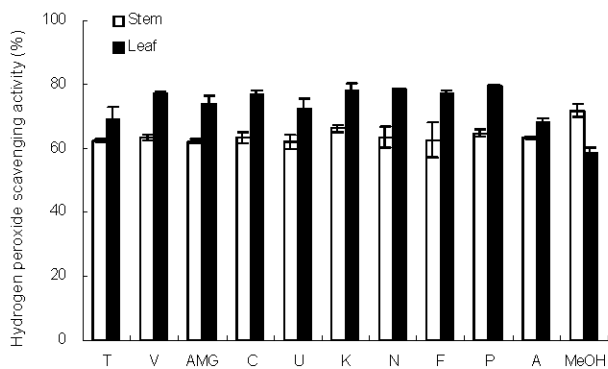


Fig. 3. Hydrogen peroxide scavenging activity of enzymatic and methanolic extracts from *E. cava* stem and leaf (2 mg/mL).

Abbreviations are the same as in Fig. 1. Mean±SE of determinations was made in duplicate experiments.

DNA 손상 억제활성

식품의 생리활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있는데, 유전 독성 억제효과를 알아보는 방법으로 세포 DNA의 손상을 측정하는 방법이 최근 널리 쓰이고 있다. 체내에서 free radical과 항산화물질 간의 균형이 깨져 free radical 생성이 항산화물질보다 많아지면 신체는 산화적 stress를 받게 되고, 그 결과 DNA와 같은 민감한 biomolecule이 손상되어 결국은 퇴행성 만성질환으로 발전될 가능성이 높아진다 (27). 따라서 본 실험에서는 세포의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 comet assay를 이용하여 각 추출물이 갖는 DNA 손상 억제활성을 분석하였다. 이 방법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례하는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후 전기영동을 하게 되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을수록 형성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다(28). 이러한 tail movement를 측정하여 DNA 손상 억제효과를 Fig. 4에 나타내었다. 줄기와 잎을 비교해 본 결과, 유의적인 차이는 없었으나 5종의 당분해 효소를 이용하여 제조한 효소적 추출물에서는 잎의 추출물이 DNA 손상 억제효과가 줄기의 추출물보다 높게 나타났으며, 5종의 단백질 분해효소를 이용한 경우에는 3종의 효소(Flavourzyme, Protamex, Alcalase)를 이용하여 제조한 효소적 추출물에서 줄기의 추출물이 잎의 추출물보다 오히려 높게 나타났다. 이러한 결과는 감태의 분해에 있어서 효소의 작용 기능이 서로 달라 그 효과가 서로 상이한 것으로 판단되며, 또한 줄기와 잎의 성분이 서로 다르기 때문인 것으로 판단된다. 모든 추출물에서 50% 이상의 우수한 DNA 손상 억제활성을 나타내었고, 그 중에서 줄기의 Alcalase 추출물에서 87.25%로 가장 우수한 효과를 보였다. Fig. 5는 이러한 결과를 한눈에 볼 수 있는 사진으로, Fig. 5A는 아무 처리도 하지 않은 세포에 대한 전기영동 사진으로서 세포가 손상을 받지 않았음을 알 수

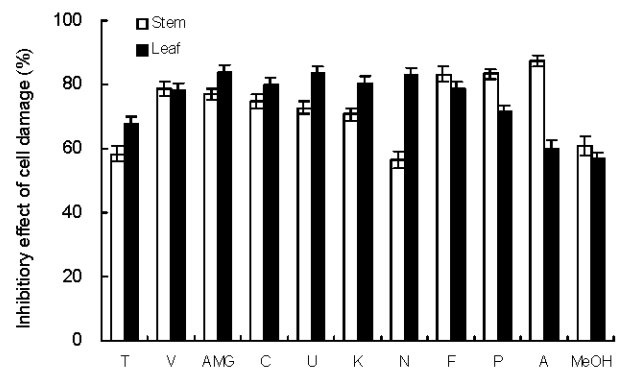


Fig. 4. The inhibition activity of enzymatic extracts and methanolic extracts from *E. cava* stem and leaf (100 µg/mL) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in L5178YR cell.

Abbreviations are the same as in Fig. 1. All values are mean±SE (n=50).

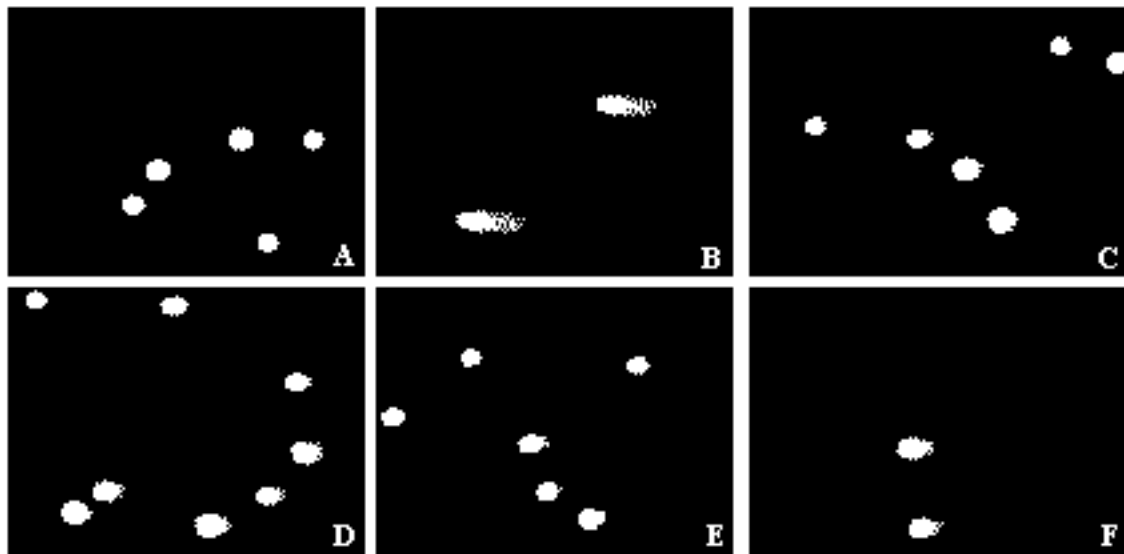


Fig. 5. Fluorimicrographs of DNA damage and migration observed under the extracts of *E. cava* stem and leaf.

(A) negative control, (B) only 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (C) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Callulact extract from *E. cava* stem+50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (D) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Alocasia extract from *E. cava* stem+50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (E) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AMG extract from *E. cava* leaf+50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (F) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Neutra extract from *E. cava* leaf+50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

있었다. 이에 비하여  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하게 되면 세포가 크게 손상을 받아 대부분의 DNA가 손상되어 해상 그리처럼 긴 모양이 형태가 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 한편  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리 전에 여러 종류의 감태 추출물들을 처리하였을 때에 DNA 손상이 현저히 줄어드는 결과를 볼 수 있었다(Fig. 5 C-F). 이와 같이 감태 추출물에 의해 DNA 손상이 현저히 줄어드는 것으로 보아, 감태를 다양한 소화효소를 이용하여 제조한 추출물은 hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 수 있을 것으로 보인다.

## 요 약

본 연구에서는 제주 연안에 서식하는 갈조류 중 감태의 줄기와 잎의 항산화활성을 비교하기 위하여 감태 줄기와 잎으로부터 효소적 가수분해와 배란물을 이용하여 각각의 추출물을 제조한 후 이로부터 활성산소종의 소거활성 및 세포의 산화적 손상 억제활성을 포함하는 항산화활성에 대한 차이를 비교 검토하였다. 여기에서 효소적 가수분해를 이용하여 제조된 감태의 효소적 추출물은 배란물 추출물에 비하여 폴리페놀 함량은 낮았으나, 수율은 약 80% 이상 높게 나타났다. 감태는 줄기와 잎의 모든 부분에서 항산화활성이 우수하게 나타났으며, 두 부위 간의 유의적인 차이는 없었으나, 대체로 잎의 추출물이 줄기의 추출물보다 약간 우수한 항산화효과를 나타내었다. 이러한 결과는 감태의 잎 뿐만 아니라 줄기 또한 마찬가지로 우수한 생리활성 재료임을 확인할 수 있었다. 그리고 배란물 추출물에 비해 효소적 추출물은 hydroxyl radical 소거활성을 제외한 전반적인 항산화 효과 분석에 있어서 더 유용한 정향을 보였다. 이와 같은

결과는 여러 가지 효소들이 복합되어진 효소가 세포벽에 있는 섬유질이나 당단백질 혹은 알칼산 고분자물질 등을 분해시키는 작용을 하여 활성물질들이 원활히 추출될 수 있도록 유도해 주는 작용을 하였기 때문이라고 사료된다. 그리고 높은 수율을 바탕으로 한 수용성의 추출물이기에 때문에 그들이 가지고 있는 생리활성물질을 식품산업에 쉽게 응용시킬 수 있으며, 유기용매와 같은 화학약품을 사용하지 않을 때에 관찰할 수도 있는 안전성에 대한 문제도 해결할 수 있을 것이다. 이상의 결과로 감태는 잎 뿐만 아니라 줄기도 잠재적 의약품 소재 및 기능성식품 소재로서의 가능성이 충분하다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년도 친환경해양산업뉴프론티어전문인력 양성사업에 의하여 지원받아 연구되었고, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Wiseman H. 1996. Dietary influences on membrane function: important in protection against oxidative damage and disease. *Nutr Biochem* 7: 2-8.
2. Guo GT, Ju JD, Chi JS, Hoag JS. 2000. The antioxidant, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* KUPFECHEIT (Oma) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
3. Cook NC, Samman S. 1998. Flavonoids chemistry, mechanism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr Biochem* 7: 66-76.
4. 강제원. 1988. 한국동식물도감(해조류). 삼화출판사, 서울, p 155-157.
5. Nagayama K, Iyamura Y, Shibata T, Hirayama I.

- Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemoth* 50: 889-893.
6. Okai Y, Higashi-Okai K, Ishizaka S, Ohtani K, Matsui-Yuasa I, Yamashita U. 1998. Possible immunomodulating activities in an extract of edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (Hijiki). *J Sci Food Agric* 76: 56-62.
  7. Chen CY, Chou HN. 2002. Screening of red algae filaments as a potential alternative source of eicosapentaenoic acid. *Mar Biotechnol* 4: 189-192.
  8. Frllich I, Riederer P. 1995. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidant treatment. *Drug Res* 45: 443-449.
  9. Heo SJ, Jeon YJ. 2005. Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Ind Nutr* 10(1): 31-41.
  10. Heo SJ, Jeon YJ, Lee J, Kim HT, Lee KW. 2003a. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a kelp, *Ecklonia cava*. *Algae* 18: 341-347.
  11. Kim KN, Lee KW, Song CB, Jeon YJ. 2006. Cytotoxic activities of green and brown seaweeds collected from Jeju island against four tumor cell lines. *J Food Sci Nutr* 11: 17-24.
  12. Yasantha A, Jeon YJ. 2005. Screening for angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of *Ecklonia cava*. *J Food Sci Nutr* 10: 134-139.
  13. Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, Cho SM, Jeon YJ. 2006. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 307-314.
  14. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of official analytical chemists, Virginia, USA.
  15. Heo SJ, Lee KW, Song CB, Jeon YJ. 2003b. Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18: 71-81.
  16. Shetty K, Curtis OF, Levin RE, Witkowsky R, Ang V. 1995. Prevention of vitrification associated with the in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *J Plant Physiol* 147: 447-451.
  17. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  18. Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 118-123.
  19. Müller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 259: 151-158.
  20. Singh NP, Graham MM, Singh V, Khan A. 1995. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of X-rays. *Int Radiat Biol* 68: 563-569.
  21. Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. 2000. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1127-1132.
  22. Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. 1988. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharm* 56: 213-222.
  23. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Biore-source Technol* 96: 1613-1623.
  24. Siriwardhana N, Lee KW, Kim SH, Ha JW, Jeon YJ. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Tech Int* 9: 339-346.
  25. 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 Chem Toxicol* 67: 1752-1756.
  26. Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. 2003. Antioxidative activity and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants (*Akebia quinata* Decaisn, *Scirusfluviatilis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* Makino). *J Agric Life Sci* 37(4): 69-75.
  27. Park EJ, Kang MH. 2002. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human bio-monitoring. *Kor J Nutr* 35: 213-222.
  28. Kang MH. 2003. Green vegetable juice reduces in vitro and in vivo DNA damage and plasma lipid concentrations. *Food Ind Nutr* 8(1): 8-14.

(2006년 8월 3일 접수; 2006년 9월 1일 채택)