

감태 추출물의 항산화 활성에 미치는 열 안정성

Thermostability of *Ecklonia cava* Extract on Antioxidant Activity.

강민철, 이원우, 오재영, 김현수, 이호근, 전유진*

Min-Cheol Kang, Won-Woo Lee, JaeYoung Oh, Hyun-Soo Kim, HyoGeun Lee, You-Jin Jeon*

제주대학교 해양생명과학부, 제주특별자치도 제주시 제주대학로 102, 63243, 대한민국

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

(Received 8 December 2017, Revised 21 December 2017, Accepted 22 December 2017)

Abstract Temperature is a major factor that affects the physiochemical properties of compounds. This study focus on the determination of thermostability and the effect of temperature on antioxidant activities of *Ecklonia cava* (*E. cava*) ethanoic extract. The ethanoic extracts of *E. cava* were evaluated at 30°C, 60°C and 90°C for 0 to 7 days. The antioxidant activities were determined by DPPH, hydroxyl radical and hydrogen peroxide scavenging activities. The intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging activity was investigated using DCFH-DA assay. Results revealed that the ethanoic extract of *E. cava* incubated at different temperatures for 0 to 7 days, showed stable scavenging activities on DPPH, hydroxyl radical and hydrogen peroxide. The ROS scavenging activities of ethanoic extract and ascorbic acid were also investigated. The extract showed a stable ROS scavenging activity from 0 to 7 day at 90°C. However, the scavenging activity of ascorbic acid at 90°C decreased starting from day 3. These results indicated that the antioxidant effects of this food grade ethanoic extract of *E. cava* could remain stable during the employed temperatures of food processing.

Keywords : *Ecklonia cava*, antioxidant, ROS, radical scavenging, thermostability

서 론

경제발전과 더불어 생활수준이 향상되고 식품에 대한 소비자들의 인식이 변화하는 가운데 식품의 기능성과 안정성을 충족시키는 식품의 개발과 수요가 증가하고 있다. 식품은 가공 및 저장 중에 여러 가지 이화학적 변화를 수반하며, 특히 과산화물의 생성과 중합체 형성으로 인하여 변색, 악취, 영양소 손실 및 독성물질 발생으로 인해 인체에 심각한 장

해를 일으키는 것으로 보고됨에 따라 이를 방지하기 위하여 BHT (butylated hydroxytoluene)와 BHA (butylated hydroxyanisole) 와 같은 다양한 항산화제가 식품에 첨가되고 있다 [1, 2].

항산화제는 식품분야에서 유지의 산화를 억제하거나 지연시키기 위해 사용되어 왔으나, 최근에는 영양학적 측면과 함께 생체 내에서 유도되는 산화의 억제나 지연을 위한 건강증진의 또 다른 대상으로 주목 받고 있다. 현재 식품에 널리 이용되고 있는

* Corresponding author
Phone: +82-64-754-3475 Fax: +82-64-756-3493
E-mail: youjinj@jejunu.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

합성 항산화제는 식품 제조 공정에서 수반되는 열처리에 의해 항산화 활성이 상당부분 손실되고, 독성 및 암을 유발하는 것으로 알려지면서 안전성에 대한 문제가 대두됨에 따라 소비자의 기피현상이 점점 더 커지고 있는 실정이다 [3, 4]. 따라서 천연물로부터 안전한 천연 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 천연 항산화제의 경우 단독으로는 산화 반응 억제 능력이 낮으며, 가격이 비싸고 열에 매우 불안정하여 식품 제조 공정에서 수반되는 열처리에 의해 항산화 활성 같은 본래의 기능이 손실되는 단점을 가지고 있다. 따라서 천연물질이면서 적은 양으로도 높은 항산화 활성을 나타내고, 식품 제조 공정에서 수반되는 열처리에 지속적으로 오랜 시간 동안 항산화 활성을 유지할 수 있는 열에 안정적인 새로운 천연항산화제의 개발이 시급한 실정이다 [5].

최근 들어, 많은 연구자들이 육상 식물이나 해조류와 같은 천연 소재로부터 뛰어난 항산화 활성을 보고하고 있고, 그들의 능력에 주목하고 있다 [6]. 특히, 해조류는 육상식물과는 다른 서식환경으로 인해 빛이나 산화에 더 강하게 적응할 수 있는 특이적인 생물학적 능력을 가지고 있다. 게다가, 예로부터 식용에 이용됨에 따라 안전성이 확보되었으며, 식품의 변질, 부패 및 화학적 변화를 방지하여 식품의 영양과 신선도를 유지할 수 있는 항산화 활성을 가진 천연 항산화제로서 그 활용 가치가 매우 높아지고 있다 [7]. 실제로 많은 연구자들이 해조류와 그들의 항산화 능력에 주목하고 있다. 특히, 해양 유래 폴리페놀을 다량 함유하고 있는 갈조류의 페추출물이 열에서 매우 안정한 항산화 활성이 밝혀졌고 [8], 감태 유래 폴리페놀 성분인 일종인 Dieckol이나 eckol 성분이 매우 우수한 항산화 효과가 있다고 보고되었다 [9, 10]. 그러나 지금까지 감태의 주요 폴리페놀 성분인 플로로탄닌 계열 성분이 포함된 추출물의 열 처리시 항산화 능력을 안정하게 유지할 수 있는 지에 대한 보고된 바가 없었다. 따라서 이 논문에서는 감태로부터 에탄올을 이용하여 추출한 후 다양한 온도 조건에서 항산화 활성을 안정하게 유지하는 지 연구하였고, 고온의 조건에서도 감태 추출물이 매우 우수한 항산화 활성을 가진다는 것을 제시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 감태 (*Ecklonia cava*)는 제주도 성산 연안에 서식하고 있는 갈조류로 2009년 8월-10월 사이에 채집한 후 흐르는 물로 수세하여 염분과 협잡물을 제거하고, 동결 건조하여 사용하였다.

에탄올 추출물의 조제

동결 건조한 감태를 곱게 갈아 각각 1 g을 취한 후 70% 에탄올 100 mL에 혼합하여 상온의 shaking incubator에서 24시간 동안 추출하였다. 그 후 3,000 × g에서 20 분간 원심분리하여 잔사를 제거한 다음 상층액을 취하였다. 그리고 난 후 상층액을 감압 여과하여 실험 시료로 사용하였다.

일반성분 분석

감태의 에탄올 추출물의 일반성분은 AOAC법 [11]에 따라 수분함량은 105°C 상압건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 550°C 건식회화법으로 분석하였으며, 탄수화물 함량은 고형분의 총량에서 수분, 회분, 조단백질 그리고 조지방의 함량을 뺀 값으로 나타내었다.

HPLC 분석

분석에 사용된 HPLC는 YOUNGLIN Acme 9000 기기를 사용하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Watchers 120, ODS-BP (5μm), 4.6*250 mm을 사용하였으며, 이동상 용매는 10% MeOH에서 100% MeOH을 사용하였다. 분석은 Gradient 조건으로 50분까지 10-100%까지를 조건으로 하여, 분석하였다.

DPPH radical scavenging activity

항산화 시료의 DPPH radical 소거활성은 Nanjo 등 (1996)의 방법에 의하여 측정하였다 [12]. 60 μL 시료 용액에 60 μL DPPH 용액 (60 μM)을 첨가하여 10 초 동안 교반한 다음 혼합 용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 2min, field: 337.1 ±5 mT, time constant: 0.3s, power: 4 mW, amplitude: 1×500 의 조건으로

로 기록한다. 항산화 시료에 대한 superoxide radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium}) \times 100.$$

Hydroxyl radical scavenging activity

항산화 시료의 hydroxyl radical 소거 활성은 Rosen 등 (1984)의 방법에 준하여 측정하였다 [13]. 즉, 항산화 시료를 일정한 농도가 되게 0.2 mL 증류수에 녹이고 여기에 0.3 M 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) 0.2 ml, 10 mM FeSO₄ 0.2 ml 및 10 mM H₂O₂/0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 0.2 mL 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮겨, ESR spectrophotometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time: 200s, field: 3461.3 ± 50 G, time constant: 0.5s, power: 1 mW, amplitude: 1×200의 조건으로 기록한다. 항산화 시료에 대한 hydroxyl radical의 소거 활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} = (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium}) \times 100.$$

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 소거활성

Hydrogen peroxide 소거 활성은 Muller [14]의 방법인 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazolin) -6-sulfonicacid (ABTS)- peroxidase system에서 H₂O₂ 소거활성을 측정하였다. 96 well plate에서 시료 용액 80 µL, 10 mM H₂O₂ 20 µL 와 phosphate buffer(pH 5.0, 0.1 M) 100 µL을 넣어 37°C에서 5분간 반응시켰다. 그 후에 1.25 mM ABTS 30 µL와 1 U/mL peroxidase 30 µL를 넣고

혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시키고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Sunrise, Tecan Co. Ltd., Austria) 를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 Hydrogen peroxide (H₂O₂) 소거활성

Vero cell을 well당 약 1.5×10⁵ cells/mL 세포수가 되도록 96 well plate에 분주 후 37°C 5% CO₂ 조건에 배양하였다. 16시간 후 시료 추출물을 다양한 농도로 처리한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. H₂O₂ (stock 20 mM)를 10 µL씩 가한 후 (최종 농도 1 mM) 다시 37 °C 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. 반응기에서 well을 꺼내어 DCF-DA (stock 500 µM)를 20 µL씩 가한 후 spectrofluormeter (excitation 485 nm, emission 535 nm)로 측정하였다. 시료를 넣지 않고 Hydrogen peroxide (H₂O₂)을 측정 한 것을 대조군으로 정하고, 시료를 넣어 hydrogen peroxide를 소거 시키는 시료 처리군과 비교하여 hydrogen peroxide 소거능을 측정하였다.

결과 및 고찰

감태의 일반성분

감태 에탄올 추출물의 일반 성분 조성은 Table 1과 같다. Polyphenol의 함량이 49.55%로 높은 함량을 보였다. 해조류들 중에 갈조류는 Polyphenol 성분을 비롯한 다당류 성분이 다량으로 함유하고 있다고 알려져 있다 [14]. 본 실험에서 또한 많은 Polyphenol 함량을 차지하고 있는 것을 확인하였다. 또한 각종 미네랄 및 비타민들을 다량으로 함유하고 있어서 회분 함량은 5.12%를 나타내었고, 단백질의 함량이 4.95%를 차지하였으며, 수분이 약 6.09%, 지방의 함량이 약 13.66% 내외의 함량을 나타내었다.

Table 1. Chemical compositions of *Ecklonia cava* (%)

Scientific name	Moisture	Ash	Polysaccharide	Protein	Lipid	Polyphenol
<i>Ecklonia cava</i>	6.09±0.40	5.12±0.50	15.69±0.73	4.95±0.29	13.66±0.89	45.99±0.29

¹⁾The values are averages of triplicate determinations.

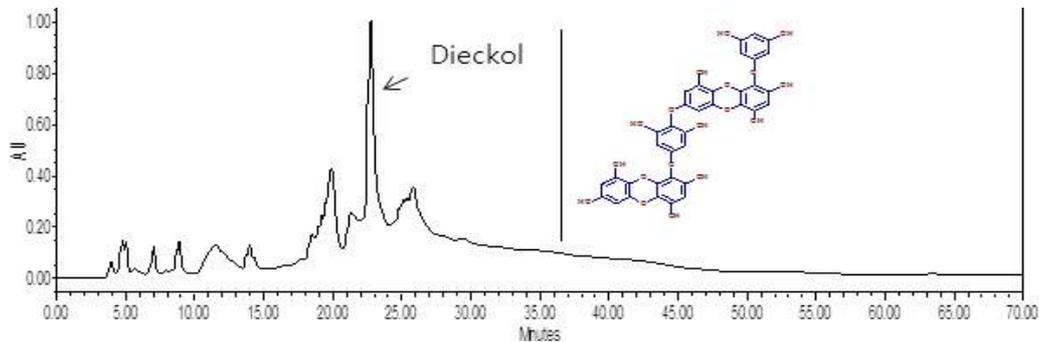


Figure 1. The HPLC chromatography of ethanoic extract of *E. cava*. Solvent A was MeOH, Solvent B was distilled water. The system was eluted using linear gradient as 10% A increased to 100% A from 0 to 50 min. The flowrate was 1 mL/min, and detector was set at 230 nm. Chemical structure of dieckol isolated from *Ecklonia cava*.

감태 에탄올 추출물의 HPLC 분석

감태 에탄올 추출물은 phlorotannins 계열인 Dieckol이 감태 추출물의 주요 성분으로서 항산화 활성 [15]이 매우 우수하다고 알려져 있다. 이러한 감태 에탄올 추출물에 Dieckol 성분 확인을 위하여, HPLC를 사용하여 분석하였다.

DPPH free radical 소거활성

생물학 체계에서 항산화제의 보호능력은 주로 항산화제의 free radical 소거능, 금속 촉매 chelating 능력, 항산화 효소의 활성, 산화 효소의 억제 작용으로 판단한다. 그 중에서도 DPPH radical 소거능에 이용되는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical은 화학적으로 유도되는 비교적 안정한 radical로서, 어떠한 반응계에서 전자를 공여 받으면 고유의 자색이 없어진다 [12]. 이 방법은 lipoxygenase에 의한 지방 산화 반응계에서의 항산화 활성 측정 결과와 잘 부합하며 간편하면서도 신뢰성이 높은 장점을 가지고 있다. Free radical은 생체내의 산화를 일으키는 주요 요인으로써, DPPH는 천연 항산화제의 free radical 소거 활성을 평가하는데 널리 사용된다. 따라서 30°C, 60°C, 90°C의 온도를 가한 시료로

DPPH radical 소거능력을 25 µg/ml의 농도로 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 30 °C에서는 감태와 항산화제로 널리 알려진 ascorbic acid의 활성의 변화가 나타나지 않았지만, 60°C나 90°C로 열을 가하였을 때, Ascorbic acid는 2일째에 급격하게 활성이 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 감태 에탄올 추출물에서는 30°C, 60°C, 90°C에서 큰 차이가 없었지만 ascorbic acid는 상온에서 93%의 활성을 보였는데 60°C에서는 7일째 25%까지 활성이 떨어졌으며 90°C에서는 ascorbic acid의 활성이 16%까지 떨어지는 것을 측정할 수 있었다.

Hydroxyl radical 소거활성

Fenton 반응에 의해서 생성된 Hydroxyl radical 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, DPPH free radical 소거활성의 결과와 비슷한 활성을 보였는데, 감태 에탄올 추출물은 Hydroxyl radical 소거 활성이 250 µg/ml에서 60% 정도로 일정하게 보이는 것을 볼 수 있었지만, Ascorbic acid의 경우에는 250 µg/ml의 농도에서 30°C에서는 거의 활성의 변화가 없었으나 60°C, 90°C에서 2일째부터, 급격히 활성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

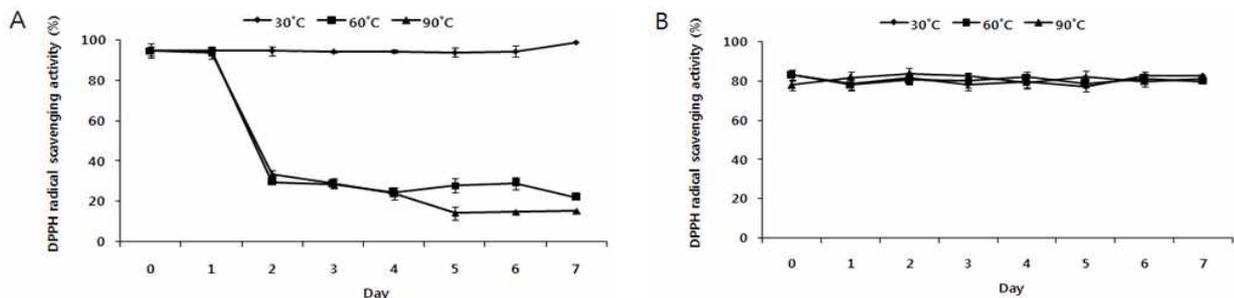


Figure 2. Thermal stability of ethanoic extract from *E. cava* and ascorbic acid in DPPH radical scavenging activity at the concentration of 25 µg/mL. A: The ascorbic acid was treated with different temperature from 0 to 7 day. B: The ethanoic extract of *E. cava* was treated with different temperature from 0 to 7 day.

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 소거활성

Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 체내 각 기관이나 세포에 심각한 손상을 초래 하여 질병이나 노화를 초래한다고 알려져 있다 [16, 17]. Fig. 3에서는 DPPH, hydroxyl radical 소거 활성을 토대로 감태 에탄올 추출물에 30°C, 60°C, 90°C로 각각 열을 가하였을 때, 각각 농도 의존적으로 Hydrogen peroxide (H₂O₂) 소

거 활성의 변화를 확인하기 위하여, Hydrogen peroxide (H₂O₂) 소거 활성을 측정하였는데, 30°C, 60°C, 90°C로 각각 열을 가하였을 때 감태 에탄올 추출물은 항산화 활성이 30°C, 60°C, 90°C에서 같은 활성을 보이는 것으로 보았을 때, 감태 에탄올 추출물의 항산화 활성은 열에 안정한 것을 확인 할 수 있었다.

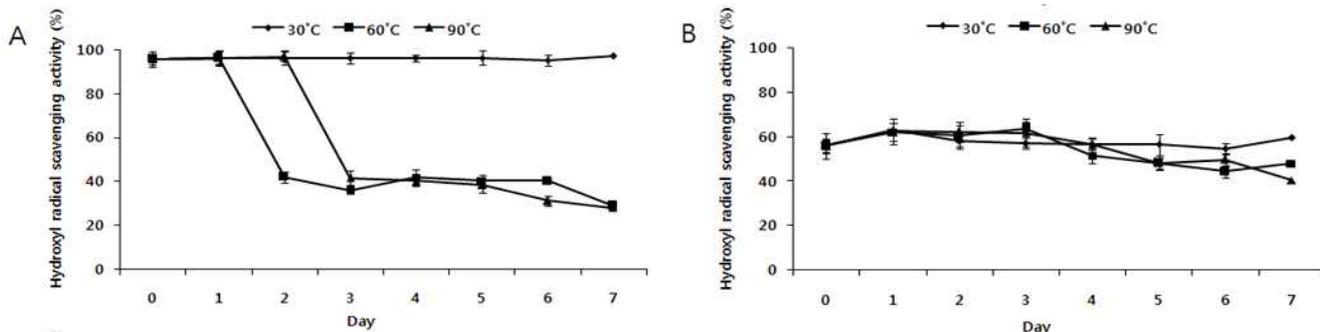


Figure 3. Thermal stability of ethanoic extract from *E. cave* and ascorbic acid in Hydroxyl radical scavenging activity at the concentration of 25 µg/mL. A: The ascorbic acid was treated with different temperature from 0 to 7 day. B: The ethanoic extract of *E. cave* was treated with different temperature from 0 to 7 day.

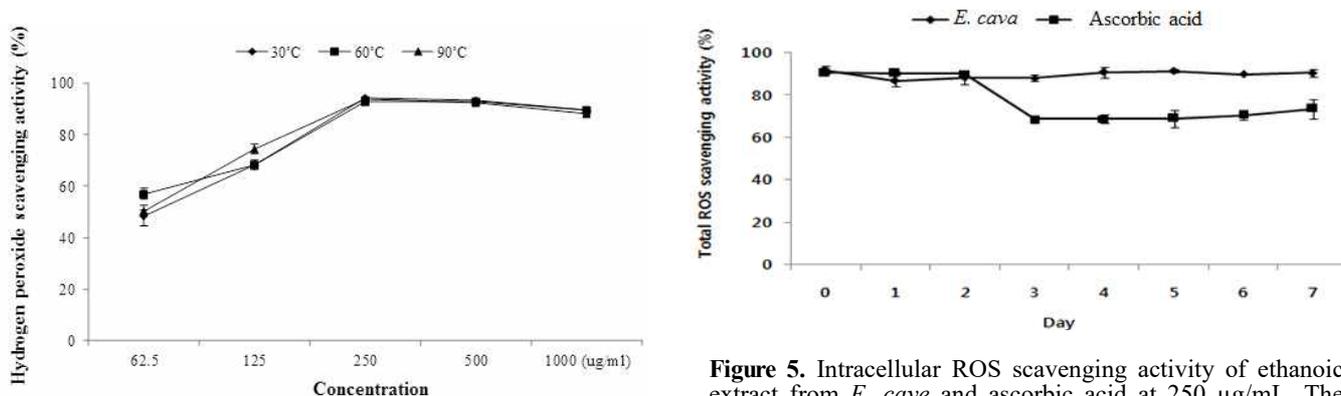


Figure 4. Hydrogen peroxide scavenging activity of ethanoic extract from *E. cave*. The samples were treated with different temperature for 7 day.

Cell 상에서의 ROS 소거활성

Hydrogen peroxide (H₂O₂)을 처리 하였을 때, DPPH, hydroxyl radical 소거 활성과 비슷한 결과로 positive control로 사용된 ascorbic acid는 활성이 열을 가하지 않았을 때에는 90%의 높은 항산화 활성을 보였으나, 7일째에는 73%까지 활성이 감소되는 경향을 보였다. 그러나 감태 에탄올 추출물의 경우에는 91%의 ROS 소거활성을 1에서 7일까지 Cell 상에서 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 제주 연안에 서식하는 갈조류 중

Figure 5. Intracellular ROS scavenging activity of ethanoic extract from *E. cave* and ascorbic acid at 250 µg/mL. The samples were treated with different temperature from 0 to 7 day.

감태의 열 안전성을 확인하기 위하여, 감태의 에탄올 추출물을 제조한 후 30°C, 60°C, 90°C로 열을 가한 후 항산화 활성을 통하여 안전성을 확인하였다. 여기서 positive control로는 항산화 활성이 뛰어난 ascorbic acid를 사용하였는데, 열을 가하였을 때, ascorbic acid의 경우에는 열을 가하였을 때 항산화 활성이 감소하는 경향을 나타내는 반면, 감태 에탄올 추출물의 경우에는 열을 가하였을 때에도 항산화 활성이 일정하게 유지 되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 보았을 때, 감태 에탄올 추출물에 포함되어 있는 우수한 항산화 활성을 가지고 있는 Dieckol 이나 eckol 과 같은 성분을 식품을 포함한

다양한 분야에서 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 이의 결과로 토대로 식품 첨가제로도 충분히 응용이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2017학년도 제주대학교 교육·연구 및 학생지도비 지원에 의해서 연구되었습니다.

References

1. Heo, S. J., Cha, S. H., Lee, K. W., Cho, S. K. and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant Activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju Island. *Algae*. **20(3)**, 251-260.
2. Heo, S. J., Cha, S. H., Lee, K. W., Lee, K. W. and Jeon, Y. J. 2006. Antioxidant Activities of Red Algae from Jeju Island. *Algae*. **21(1)**, 149-156.
3. Kim, Y.D., Mahinda, S., Koh, K. S., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Jeju Native Citrus Peel during Maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **38(4)**, 462-469.
4. Hyon, J.S., Kang, S. M., Han, S. W., Kang, M. C., Oh, M. C., Oh, C. K., Kim, D. W., Jeon, Y. J. and Kim, S. H. 2009. Flavonoid Component Changes and Antioxidant Activities of Fermented Citrus grandis Osbeck Peel. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **38(10)**, 1310-1316.
5. Lee, S. H., Kim, A.D., Kang, M. C., Lee, B. L. and Jeon, Y. J. 2009. Potential Antioxidant Activities of Enzymatic Digests from Fresh Water Microalgae, *Pediastrum duplex* and *Dactylococcopsis fascicularis*. *Algae*. **24(3)**, 169-177.
6. Heo, S. J. and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant Effect and Protecting Effect against Cell Damage by Enzymatic Hydrolysates from Marine Algae. *Food Industry and Nutrition*. **10(1)**, 31-41.
7. Kim, B. M., Jun, J. Y., Park, Y. B. and Jeong, I. H. 2006. Antioxidant Activity of Methanolic Extracts from Seaweeds. *J Korean Sci Nutr*. **35(8)**, 1097-1101.
8. Kim, M. J., Choi, J. S., Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W.R., Lee, S. J., Kim, S. J., Yoon, S. Y., Jeon, Y.J. and Ahn, D. H. 2009. Effects of Heat and pH Treatments on Antioxidant Properties of *Ishige okamurai* Extract. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* **41**, 1, 50-56.
9. Lee, S. H., Kim, K. N., Cha, S. H., Ahn, G. N. and Jeon, Y. J. 2006. Comparison of Antioxidant Activities of Enzymatic and Methanolic Extracts from *Ecklonia cava* Stem and Leave. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **35(9)**, 1139-1145.
10. Kim, K. N., Heo, S. J., Song, C. B., Lee, J. H., Heo, M. S., Yeo, I. K., Kang, K. A., Hyun, J. W. and Jeon, Y. J. 2006. Protective effect of *Ecklonia cava* enzymatic extracts on hydrogen peroxide-induced cell damage. *Process Biochemistry*. **41**, 2393-2401.
11. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of official analytical chemists, Virginia, USA.
12. 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 Radic Biol Med*. **21(6)**, 895-902.
13. Rosen, G.M., Rauckman, E.J. 1984. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods Enzymol*. **105**, 198-209.
14. Muller, H.E. 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS peroxidase medium. *Zentralbl Bakterio Mikrobio hyg*. **259**, 151-158.
15. Ahn, G. N., Kim, K. N., Cha, S. H., Song, C. B., Lee, J., Heo, M. S., Yeo, I. K., Lee, N. H., Jee, Y. H., Kim, J. S., Heu, M. S. and Jeon YJ. 2007. Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *Eur Food Res Technol*. **226**, 71-79.
16. Kim, K. N., Heo, S. J., Cha, S. H. and Jeon, Y. J. 2006. Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity of Jeju Seaweeds Using High Throughput Screening (HTS) Technique. *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology*. 170-177.
17. Ko, S. C., Kang, S. M., Ahn, G. N., Yang, H. P., Kim, K. N. and Jeon, Y. J. 2010. Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from *Sargassum coreanum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **39(4)**, 494-499.