

## 미역 포자엽에서 분리한 항산화물질의 특성

유미영 · 김상권<sup>1</sup> · 양지영\*

부경대학교 식품생명공학부, 수산식품연구소, <sup>1</sup>(주)청호씨푸드

**Characterization of an Antioxidant from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*.** Yoo, Mi-Young, Sang-Kwon Kim<sup>1</sup>, and Ji-Young Yang\*. Division of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, Institute of Seafood Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, <sup>1</sup>Chung-Ho Sea Food Co., Ltd, Kijang-gun, Busan 619-900, Korea – Hot water soluble extract from sporophyll of *Undaria pinnatifida* was examined for antioxidant activity using 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) and lipid peroxidation assay. The IC<sub>50</sub> value (7.6 mg/ml) of hot water extract from sporophyll of *U. pinnatifida* was more higher than ascorbic acid (0.025 mg/ml) and BHT (0.25 mg/ml). The hot water extract from sporophyll of *U. pinnatifida* was stable from pH 2 to pH 7 but decreased at alkali pH. The heat stability of hot water extract from sporophyll of *U. pinnatifida* was stable from 0°C to 120°C. An effect on an antioxidant activity of hot water extract from sporophyll of *U. pinnatifida* was studied with various metal ions and EDTA. Antioxidant activity of hot water extract from sporophyll of *U. pinnatifida* was inhibited by EDTA but increased by adding Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, respectively.

**Key words:** Sporophyll, *Undaria pinnatifida*, antioxidant, pH, heat stability

반응성이 강한 산소화합물(reactive oxygen species:ROS)은 생체 내에서 계속적으로 생성되며 축적된다. 생체 내에서는 이에 대한 방어기전으로서 산화억제물질(antioxidant)를 형성한다. 그러나 경제가 발달하고 물질이 풍요해짐에 따라 스트레스, 환경오염, 운동부족, 비만, 약물, 유전적 요인 등에 의해 더 많은 산화물에 노출되고 이로 인해 산화로 인한 각종 질병의 발생이 증가하는 추세이다. 이에 산화방어 물질인 항산화물을 함유한 식품의 섭취 및 건강보조식품으로서의 섭취가 필요하게 되었다.

항산화와 관련된 많은 연구들을 살펴보면 지질의 과산화 및 항산화[5, 6, 13], 노화억제에 대한 연구[21]와 같이 산화기작 및 억제에 대한 연구로부터 항산화물질의 탐색에도 많은 연구가 보고되고 있다. 그러나 주로 콩[23], 마늘[25], cranberry[4], herb류[2] 등 육상식물이나 조류[22], 미생물[22]로부터 항산화물질을 탐색보고하고 있다. 해조류의 경우 지방은 1%전후로 적은 양을 함유하고 있으며 지방산조성을 살펴보면 palmitic acid, myristic acid, stearic acid 등의 포화지방산과 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등의 불포화지방산을 함유하고 있다. 특히, 미역, 다시마와 같은 갈조류의 경우 육상식물에서는 전혀 보이지 않는 arachidonic acid, eicosanpentanoic acid 등의 고도불포화지방산을 많이 함유하는 특징을 갖고 있다. 이런 고도불포화지방산은 기능

적으로 우수한 재료이기도 하지만 산패가 잘 되는 특징을 갖고도 있다. 그럼에도 해조류 내에서는 산화되지 않고 유지된다는 것은 해조류 내에는 이런 고도불포화지방산의 산패를 억제하는 물질 즉 항산화물질을 함유하고 있다고 알려져 있다[16].

해조류에 대한 기능적 연구는 지방산화합물, phenol/tannin류, 할로젠류, terpene류 등 화합물들에 의한 항균, 항바이러스 작용, 다당류, terpenoid, 3-bromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol에 의한 항암작용, 아미노산, 알긴산에 의한 혈압저하 및 콜레스테롤 억제작용 외에도 항충치작용, 유해중금속 제거작용, 효소활성화 및 억제작용등에 대한 연구보고는 있지만, 항산화 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다[17].

미역(*U. pinnatifida*)은 갈조류의 미역과에 속하는 1년생 해조류로서 다른 갈조류와 비교해서 단백질, 지질, 당질, 비타민 등 모든 영양소를 고루 함유하고 있을 뿐 아니라, 무기질 성분인 칼슘 및 요오드가 풍부하게 들어있는 식품으로 널리 식용되고 있으나 미역포자엽의 경우 엽상체와는 다른 구조를 갖고 있으며 현재 일부만이 건조제품으로 소비되어질 뿐이다. 이에 본 연구에서는 미역부위 중에서 미역 포자엽을 이용하여 항산화물질을 분리하여 DPPH 라디칼 소거능에 대하여 IC<sub>50</sub>과 온도 및 pH 안정성을 조사하고 항산화능에 미치는 금속이온에 대한 영향을 조사하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-51-620-6419, Fax: 82-51-622-9248

E-mail: jyyang@pknu.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 미역 포자엽(sporophyll of *U. pinnatifida*)은 기장지역에서 재배된 북방산 개량종으로서 2003년 2월에 채취한 시료로서 (주)청호물산에서 제공받아 실험에 사용하였다. 미역 포자엽은 음건 후 분쇄(BRAUN Type 4041, Mexico)하여 분말로 사용하였다. 본 실험에 사용한 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였으며, tween 20, DPPH(1,1-diphenyl-picrylhydrazyl), linoleic acid, BHT(butyl hydroxyl toluene)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

항산화 물질 추출

건조 분말 미역 포자엽(sporophyll of *U. pinnatifida*) 250 g에 증류수 700 ml을 넣고 60°C에서 30분간 진탕 추출한 후, 여과지(Whatman no. 2, Toyo Co., Japan)를 사용하여 여과하였다. 여과액에 3배수의 아세톤을 처리하여 침전물을 제거하고 상등액을 취한 후, 이에 다시 활성탄(Shinki Chemical Co., Korea)을 이용하여 색소를 제거한 후 rotary vacuum evaporator(N-1000, Eyela Co., Japan)를 사용하여 농축하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

항산화능 측정

미역 포자엽으로부터 항산화능 활성을 측정하는 방법으로 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl(DPPH)을 사용하여 Blois의 방법 [2]을 변형하여 사용하였다(Fig. 1). 시료 0.2 ml에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH를 0.8 ml를 넣고 vortex 한 후, 10분동안 실온에서 방치한 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서 시료 용액 대신에 같은 양의 에탄올을 가하여 진탕하고 방치한 후 흡광도를 측정하였다. Free radical scavenging 활성능은  $100 - [(시료\ 첨가구의\ 흡광도 / 대조구의\ 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었으며, free radical scavenging의 50% 소거농도 (IC<sub>50</sub>)를 계산하여 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

추출물의 pH 안정성 실험

시료 0.2 ml에 pH별로 제조한 완충용액 0.6 ml을 가해 실온에서 1시간 방치 한 후 다시 완충용액을 이용하여 pH 6으로 조정하여 항산화능을 측정하였다. 이때 사용한 완충용액은 pH 2~6은 20 mM citrate-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7~8은 20 mM Tris-HCl, pH 9~10은 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 완충용액을 각각 사용하였다.

추출물의 열안정성 실험

시료 1 ml을 0°C에서 120°C의 처리온도별로 1시간 처리한 후 실온으로 냉각하였다. 이와 같이 처리된 액을 시료로

하여 DPPH법을 이용하여 항산화능을 측정하였다.

추출물의 금속 이온 및 EDTA에 대한 영향

각 농도별 시료에 금속 이온 및 EDTA를 최종 농도가 1 mM이 되도록 맞춘 후, 항산화능을 측정하였다. 이때 이용한 항산화능 측정방법은 각 농도별 시료 0.5 ml에 tween-emulsified linoleic acid 용액 2.5 ml, 0.2 M phosphate buffer(pH 7) 2 ml을 각각 첨가 한 후 37°C에서 60시간 보관하였다. 이를 다시 산화된 기질 0.1 ml에 30% NH<sub>4</sub>SCN 0.1 ml과 20 mM FeCl<sub>2</sub> 0.1 ml을 혼합 한 후 3분 경과 후 분광광도계(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech Co., England)를 이용하여 500 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

미역포자엽 추출물의 항산화능

미역 포자엽으로 부터 분리한 열수추출물의 농도에 따른 항산화능을 측정한 결과 Fig. 2에 나타내었다. 미역포자엽의 열수추출물 2 mg/ml의 농도에서 32.6%의 free radicals 소거능을 보였으며, 15 mg/ml와 20 mg/ml에서 80%와 90%의 free radicals 소거능을 각각 나타내었다. 또한 50% free radicals 소거능을 나타내는 IC<sub>50</sub>은 Table 1에 나타내었다. 천연 항산화제인 ascorbic acid는 0.025 mg/ml이었으며 합성항산화제인 BHT는 0.25 mg/ml을 나타낸 반면 미역포자엽으로 부터 분리한 추출물은 7.6 mg/ml을 나타내었으며 이들 값의 결정계수(R<sup>2</sup>)는 각각 0.95, 0.98, 0.97로 나타났다. 천연 항산화제인 L-ascorbic acid와 합성항산화제인 BHT에 비해서는 효과는 떨어지지만 이는 정제되지 않은 조추출물의 상태로 분리정제 시 더 낮은 IC<sub>50</sub>값을 기대할 수 있다. Pinelo 등 [18]은 almond hull과 pine sawdust에서 항산화물질인 polyphenol 화합물 분리시 methanol이 좋은 용매라 보고하였으며, Ng 등[15]은 2종류의 *Panax*와 *Codonopsis*속, *Pseudostellaria*속, *Glehnia*속으로부터 적혈구 hemolysis활성을 나타내는 항산화물질추출시 *Glehnia*속과 *Codonopsis*속

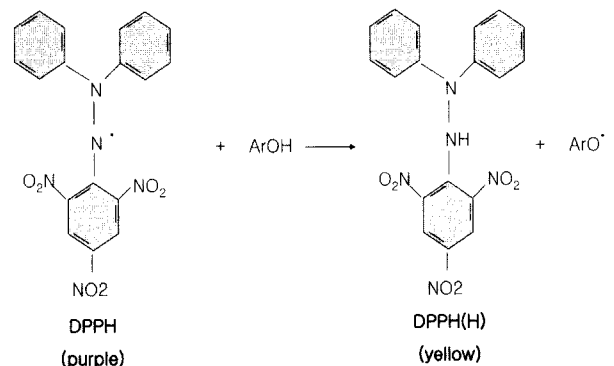
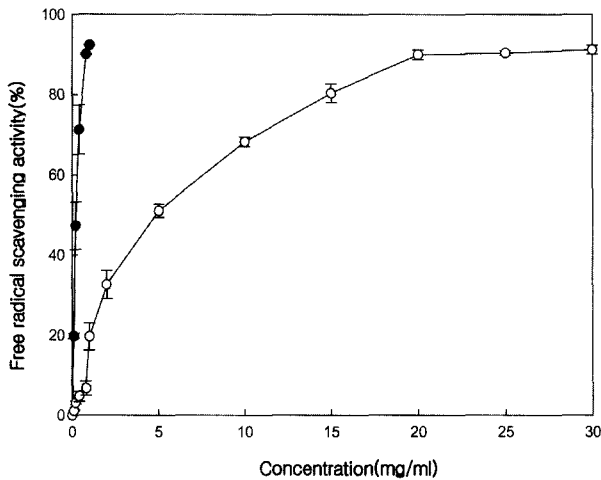


Fig. 1. Principle of radical scavenging-measuring method on hot-water extracts from sporophyll of *Undaria pinnatifida*.

**Table 1.** Scavenging activity of antioxidants of hot-water extracts from sporophyll of *U. pinnatifida* for DPPH<sup>a</sup> free radical.

Sample	IC <sub>50</sub> (mg/ml) <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>
Ascorbic acid	0.025	0.95
BHT	0.25	0.98
Sporophyll of <i>Undaria pinnatifida</i>	7.6	0.97

<sup>a</sup> The final concentration of DPPH ethanolic solution was 2×10<sup>-4</sup>M.  
<sup>b</sup> The IC<sub>50</sub>(mg) values were calculated from the slope equations of the dose-response curve.

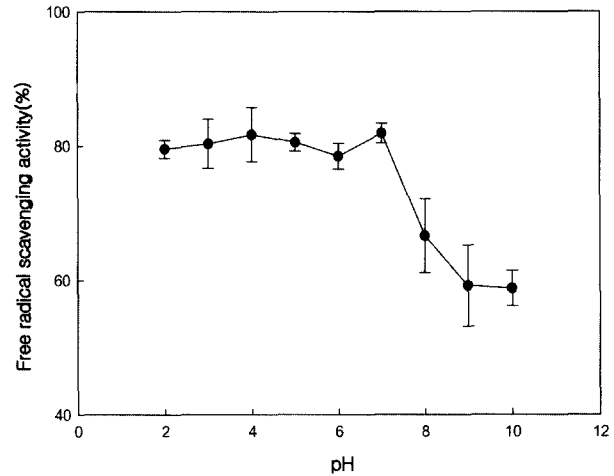


**Fig. 2.** Free radical scavenging activity of hot-water extracts from the sporophyll of *U. pinnatifida*. ●-: L-ascorbic acid, ○-: Extract of the sporophyll of *U. pinnatifida*.

의 경우 물이 좋은 추출용매이었으며 지질산화방지 항산화 물질추출의 경우에는 유기용매가 적절하였다고 보고하고 있다. Han 등[8]에 의하면 미역 열상체의 메탄올 추출물 1.80 mg/ml에서 35.8%의 free radical 소거능이 있다고 보고하였으며, Takamatsu 등[22]은 *Cymopolia barbata*라는 해양조류로부터 CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/methanol을 사용하여 추출분리·정제한 물질인 cymopol과 7-hydroxycymopol이 아주 강력한 free radical 소거 활성능을 가지고 있다고 보고하였다. Pratt[19]에 의하면 콩의 항산화 효과의 원인 물질은 당과 결합하고 있어 냉수와 온수에 모두 잘 녹는다고 보고하였다.

**미역포자엽 추출물의 pH 안정성**

미역 포자엽으로 분리한 열수추출물의 pH안정성을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. pH 2~7까지는 안정하게 80% 이상의 free radical 소거능을 유지하였으나, pH가 알카리쪽으로 갈수록 항산화 효과가 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 항산화 효과를 보이는 물질이 중성이나 산성에서는 안정적이나 알카리성에서는 불안정한 물질임을 알 수 있었다. Ungar 등[23]의 보고에 의하면 콩의 항산화물질인

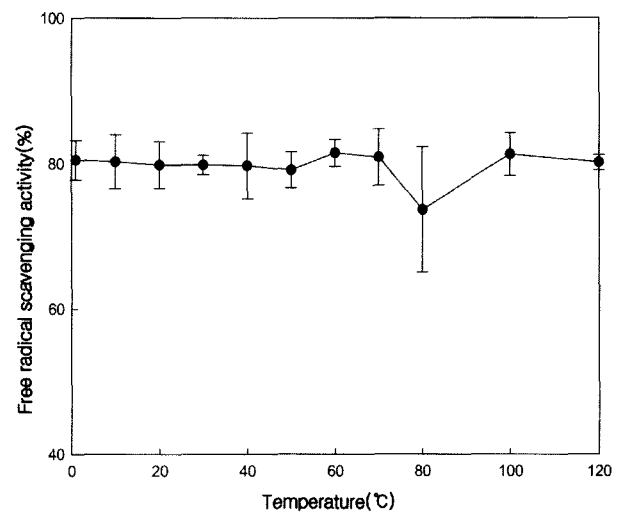


**Fig. 3.** Effect of pH on stability of antioxidant activity in hot-water extracts from sporophyll of *U. pinnatifida*

daidzein은 pH 7과 pH 9에서 완만한 감소를 나타낸 반면 genisteine은 pH 7에서는 완만히 감소하였으나 pH 9에서는 급격히 활성이 감소되어 알카리에서 불안정하다고 보고하였으며, Yin 등[25]의 보고에 의하면 마늘의 4개 organosulfur 화합물중 DAS(diallylsulfide)와 DADS(diallyldisulfide)는 pH 2.5에서 pH 10의 범위에서 안정하였다.

**미역포자엽 추출물의 열안정성**

미역 포자엽으로 분리한 열수추출물의 열안정성을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 0°C에서 120°C까지 실험한 모든 온도범위에서 큰 감소 없이 일정하게 80%의 항산화능을 유지하는 결과를 보여 주었다. 이는 항산화능을 나타내는 물질이 열에 아주 안정한 물질임을 알 수 있었다. Ungar 등[23]의 보고에 의하면 콩의 항산화물질인 isoflavone은 70°C



**Fig. 4.** Effect of temperature on stability of antioxidant activity in hot-water extracts from sporophyll of *U. pinnatifida*.

**Table 2. Effect of various metals and EDTA on antioxidant activity of hot-water extracts from sporophyll of *U. pinnatifida*.**

Metals and EDTA	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
AlCl <sub>3</sub>	1	97.8
CaCl <sub>2</sub>	1	99.5
CoCl <sub>2</sub>	1	148.1
CuCl <sub>2</sub>	1	155.9
FeCl <sub>3</sub>	1	97.5
HgCl <sub>2</sub>	1	85.5
KCl	1	87.9
PbCOOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	1	102.1
MgSO <sub>4</sub>	1	98.8
MnSO <sub>4</sub>	1	117.0
NaCl	1	87.3
SrCl <sub>2</sub>	1	86.4
Zn	1	88.9
EDTA	1	79.3

에서 90°C의 범위에서 1차 kinetic의 양상으로 안정성을 나타내었으며 Yin 등[25]의 보고에 의하면 마늘의 항산화물질인 4개의 organosulfur화합물들은 모두 65°C에서 항산화활성이 감소되었다. Gonzalez 등[7]은 *Eucalyptus globulus* 나무로 유래된 항산화물질은 4°C에서 2달간 보관시 안정하였으나 30°C에서 2달간 보존시 30%가 감소하였고 40°C에서 2달간 보존시에는 48%가 감소하였다고 보고하였다.

#### 미역포자엽 추출물의 금속 이온 및 EDTA 영향

미역 포자엽으로 분리한 열수추출물의 금속 이온 및 EDTA에 대한 영향을 실험한 결과를 Table 2에 나타내었다. 조사한 금속이온의 1가, 2가에 관계없이 실험에 사용한 금속염은 1 mM 농도에서 금속염을 첨가하지 않은 경우에 비해 Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 등의 금속이온을 처리한 실험구가 상대활성이 증가하는 결과를 보여주었으며, 그 외 금속이온은 유지내지는 감소하는 경향을 나타내었다. EDTA를 처리하였을 경우 가장 활성이 저하되었으며 이는 금속이온과의 chelating에 의해 활성이 감소됨을 알 수 있었다. Ai 등[1]에 의하면 Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 등은 hydroxy radical( $\cdot$ OH)과 superoxide anion(O<sup>2-</sup>) 등의 생성을 촉진한다고 보고하였으며, 이 등[14]에 의한 보고에 의하면 Fe<sup>2+</sup>와 Cu<sup>2+</sup>에 대한 결합능이 우수할수록 높은 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였다.

#### 요 약

미역포자엽으로부터 열수추출을 통해 항산화물질을 조제하고 항산화와 관련된 특성을 조사하였다. 미역포자엽으로부터 조제한 열수추출물은 시료 양에 따라 2차곡선의 항산화능을 보여주었으며 IC<sub>50</sub>의 값은 1.54 mg을 나타내었다 이

는 ascorbic acid 0.005 mg과 BHT 0.05 mg에 비해서는 높은 값을 나타내었다. 미역포자엽으로부터 조제한 열수추출물의 pH안정성은 산성과 중성에서는 안정하였으나 알칼리영역에서는 급격히 감소하였다. 또한 열안정성은 0도에서 120도의 모든 범위에서 안정한 값을 유지하였다. 미역포자엽으로부터 조제한 열수추출물의 금속이온과 EDTA가 항산화능에 미치는 영향을 조사한 결과 Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 등의 금속이온이 활성이 증가하는 결과를 보여주었으며 EDTA는 저해하는 결과를 보여주었다.

#### 감사의 글

이 논문은 2003년도 Brain Busan 21사업에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

1. Ai, S., T. Soichi, and N. Toshihide. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 3661-3667.
2. Albu, S., E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, and T. J. Mason. 2004. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. **11**: 261-265
3. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **4617**: 1198-1200.
4. Chen, H., Y. Zuo, and Y. Deng. 2001. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. **913**: 387-395
5. Cho, S. H. 1993. Lipid peroxidation and antioxidant nutrition. *Kor. J. Lip.* **3**: 23-32.
6. Choi, M.Y., E. J. Choi, and E. Lee. 1999. Effect of *Rhus chinensis* gall extract on liver function, plasma lipid composition and antioxidant system in rats with high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 632-637.
7. Gonzalez, J., J. M. Cruz, H. Dominguez, and J. C. Parajo. 2004. Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chem.* **84**: 243-251.
8. Han, J., S. Kang, R. Choue, H. Kim, K. Leem, S. Chung, C. Kim, and J. Chung. 2002. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia* **73**: 710-712.
9. Kim, S. J., J. S. Moon, J. M. Kim, S. G. Kang, and S. T. Jung. 2004. Preparation of jam using *Undaria pinnatifida* sporophyll. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 598-602.
10. Kim, W. J., and H. S. Choi. 1994. Development of combined methods for effective extraction of sea mustard. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 44-50.
11. Koo, J. G., Y. S. Choi, and J. K. Kwak. 2001. Blood-antico-

- agulant activity of fucoidans of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J. Kor. Fish. Soc.* **34**: 515-520.
12. Koo, J. G. 2001. Biosorption of lead and cadmium by fucoidan from *Undaria pinnatifida*. *J. Kor. Fish. Soc.* **34**:521-525.
  13. Lee, J. M., S. W. Choi, S. H. Cho, and S. J. Rhee. 2003. Effect of seeds extract of *Paeonia lactiflora* on antioxidative system and lipid peroxidation of liver in rats fed high-cholesterol diet. *Kor. J. Nut.* **36**: 793-800.
  14. Lee, Y. J., and J. P. Han. 2000. Antioxidative activities and nitrite scavenging activities of extracts from *Ulmus devidiana*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 893-899.
  15. Ng, T. B., F. Liu, and H. X. Wang. 2004. The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis*. *J. Ethnopharmacology*. **93**: 285-288
  16. Ooishi, K. 1994. Science of Seaweed. pp.142-145. 2nd ed. Asakura Press. Shinjuku, Tokyo, Japan.
  17. Ooishi, K. 1994. Science of Seaweed. pp.160-181. 2nd ed. Asakura Press. Shinjuku, Tokyo, Japan.
  18. Pinelo, M., M. Rubilar, J. Sineiro, and M. J. Nunez. 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem.* **86**: 267-273.
  19. Platt, D. E. 1972. Water soluble antioxidant activity in soybeans. *J. Food Sci.* **37**: 322-323.
  20. Ruperez, P., O. Ahrazem, and J. A. Leal. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 840-845.
  21. Ryu, S. H., and G. S. Moon. 2003. Antioxidative and antiaging effects of dietary yellow and black soybean in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 591-597.
  22. Takamatsu, S., W. H. Tyler, R. Ira, H. G. William, T. H. Mark, and G. N. Dale. 2003. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod.* **66**: 605-608.
  23. Ungar, Y., O. F. Osundahunsi, and E. Shimoni. 2003. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 4393-4399.
  24. Yoon, J. A., K. W. Yu, W. J. Jun, H. Y. Cho, Y. S. Son, and H. C. Yang. 2000. Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweed and optimization of extraction condition. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 1098-1106.
  25. Yin, M. C., S. W. Hwang, and K. C. Chan. 2002. Nonenzymatic antioxidant activity of four organosulfur compounds derived from garlic. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6143-6147.

(Received Sep. 22, 2004/Accepted Nov. 10, 2004)