식품산업과 영양 10(1), 31~41, 2005 Food Industry and Nutrition

산·학·연 논단

해조류의 효소적 가수분해물에 의한 항산화 효과와 세포손상 억제활성

허수진 · 전유진†

제주대학교 해양생물공학과

Antioxidant Effect and Protecting Effect against Cell Damage by Enzymatic Hydrolysates from Marine Algae

Soo-Jin Heo and You-Jin Jeon†

Dept. of Marine Biotechnology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

서 론

산소는 인체내 소화 및 에너지 생성 등 여러 대사과정에 관여하고 생물의 생존에 가장 필수적인 물질이지만, 반응성이 매우 큰 활성산소로 전화되면 생체에 큰 영향을 미친다. 활성산소의 종류로는 일반적으로 lipid radical($LOO^{\cdot}$), superoxide radical($O_2^{\cdot}$) 및 hydroxyl radical($^{\cdot}OH$)과 같은 radical 뿐만 아니라 비라디칼인 singlet oxygen($^1O_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hypochlorous acid(HOCl), lipid peroxide(LOOH), N-chloramine 성분들을 포함한다. 이러한 활성산소 생성의 생체 내적 요인으로는 세포 대사작용, 산화 효소, 박테리아 작용 등을, 생체 외적 요인으로는 오염된 공기, 대사율 증가, 흡연, 발암물질, 특정 항생제, 자외선, 열, 인스턴트 음식의 과량섭취 등을 들 수 있다. 이들 활성산소들은 단백질, 불포화 지방산 등과 결합하여 과산화 지질을 생성하고, DNA, RNA 등에 손상을 일으키며, 생체막의 손상, 면역능력의 약화와 함께 성인병 및 각종 질병과 노화를 유발시키게 된다(1-4). 따라서 이러한 활성산소들을 효과적으로 제어시키는 천연물의 생리활성물질에 대한 연구가 자연스럽게 증가하게 되었다.

세계 8대 해양국의 하나인 우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸여 있고 비교적 해양생물 자원이 풍부한 입지조건을 가지고 있음에도 불구하고, 아직까지 해양생물자원을 단순한 식량자원으로서만 이용할 뿐 생명공학 기법을 이용하여 다방면으로 활용하기 위한 체계적인 연구가 미흡한 실정이다. 그런데 최근에 와서 기능성 식품소재나 의약품 소재로서 해양생물의 유용성이 밝혀지면서 해양생물들로부터 생리활성물질의 개발 혹은 기능성 바이오 소재의 개발에 관련된 연구가 많이 진행되고 있다(5,6). 이러한 해양 생물은 높은 염의 농도, 수압 그리고 체표면이 해수에 노출되어 있어 병원 미생물의 침입을 받기 쉽고, 육상생물과는 매우 다른 환경에 서식하고 있으므로 그 진화과정이 육상 생물계와는 전혀 다른 대사계나 생체 방어계를 발전시켜 왔음을 추측할 수 있다. 따라서 해양 천연물의 대사산물들은 새로운 형태의 화학구조와 다양한 생리활성을 보여주고 있다(7,8). 그 중에서 해조류는 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 해조류가 내재하고 있는 잠재적인 활성들을 엿볼 수 있다(9-12). 현재까지 우리나라의 해조산업은 대부분 단순 건조가공에 의하여 수출되거나 식품첨가제 혹은 건강보조식품으로 극히 일부만이 사용되어지고 있는 형편이다. 따라서 본고에서는 해조류에 생물공학 기법 중 하나인 효소적 가수분해방법을 적용하여 해조류가 갖고 있는 미량성분들 중 항산화 효과와 세포손상 억제 활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성 식품 및 의약품으로서의 가치를 알아보고자 하였다.

해조류에 대한 항산화 연구

최근 들어 건강에 대한 관심이 증폭되면서 천연물들이 갖는 phytochemical과 그들이 갖는 활성에 대한 연구가 증대되고 있다. 해조류는 양적으로 매우 풍부하게 먹을 수 있는 식품으로써 건강에 필수적인 여러 가지 무기염류들을 다량 함유하고 있으며, 동시에 단백질 같은 체구성

†Corresponding author. E-mail: youjinj@cheju.ac.kr
Phone: 064-754-3475. Fax: 064-756-3493

영양소도 함유하고 있다. 그리고 식물성 섬유인 알긴산과 칼슘이온(Ca^{++}), 요오드 성분이 많이 포함되어 있어서 대장의 연동운동을 도와주고 골다공증을 예방해주며, 갑상선 부종을 억제시키는 역할을 하기도 한다. 또한 해조류의 어떤 성분들은 항균, 항암, 항산화 등 많은 생리활성을 갖고 있다고 알려져 있다(10-13). 이러한 분야들 중 항산화 활성에 관심을 갖는 이유는, 국민소득이 증대됨에 따라 식생활이 서구화되면서 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 비만 등 각종 성인병이 유발되고, 사회가 점차 고도화됨에 따라 고령화 인구가 늘어나게 되면서 건강문제에 대한 인식이 바뀌게 되었기 때문이다.

천연 항산화제는 지금까지 여러 종류가 분리되었다고 보고하고 있지만 토코페롤 이외에는 인체독성, 양적, 경제적인 문제로 인해 거의 사용되지 않는 실정이다. 또한 최근 많이 사용되고 있는 페놀계 합성 항산화제인 BHA (butylated hydroxyanisol)와 BHT(butylated hydroxy-toluene)는 다른 항산화제에 비해 뛰어난 활성을 지닌다고 평가받고 있지만 50 mg/kg/day 이상을 섭취하였을 시에는 생체효소 및 지방의 변화로 인해 암 및 각종 질병을 유발하는 등 거의 모든 합성 항산화제는 인체에 독성을 가진다고 보고되어 있다(14). 따라서 강력하면서도 인체에 해가 되지 않는 천연 항산화제의 개발에 관한 연구가 요구되고 있는 실정이다.

현재까지 연구되어진 천연 항산화제로는 인삼, 녹용, 구기자, 버섯 등의 생약제나 식생활에 많이 이용되고 있는 콩, 녹차 등 육상식물들을 이용한 연구가 가장 많이 이루어져 있다(15-17). 해조류에서는 육상식물들에 비해 그다지 많은 연구가 이루어지지는 않았지만 해조류를 많이 섭취하는 일본과 유럽의 일부에서 많이 연구되어져 있다. Kaneda와 Ando(18)는 20여종의 해조류 중 김에서 항산화 활성을 나타내는 phospholipids를 분리하는데 성공한 바가 있고, Yan 등(19)은 갈조류인 *Sargassum kjellmanianum*로부터 분리한 phlorotannins성분이 우수한 지질과산화 억제효과를 보인다고 밝힌 바 있다. 또한 Yan 등(20)은 톳의 acetone 추출물에서 우수한 항산화 효과를 나타내어 이것을 분석한 결과 fucoxanthin이라는 것을 밝혀내었고, Estrada 등(21)은 남조류인 *Spirulina platensis*의 phycocyanin성분이 우수한 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다고 보고하였다.

우리 나라에서도 우리가 일상에서 많이 접할 수 있는 해조류들에 대한 연구는 상당수 이루어져 있는데, Park 등(22)은 김, 미역 그리고 다시마 등에서 BHA보다 우수한 항산화 물질을 얻었다고 보고한 바 있다. 또한 Siriwardhana 등(23)은 갈조류인 톳에서 항산화 활성을 검색한 결과 여러 가지 용매 획분에서 활성 산소종 소거활성과 지질과산화 억제활성을 보인다고 보고하였다. 이러한 연구들은 대부분이 유기용매 추출과 열수 추출을 이용하여 실험을 수행하였는데, 우수한 항산화 효과를 나타내는 반면에 추출 수율이 낮았고, 추출시 고온을 이용하였기 때문에 열에 불안정한 항산화 물질이 파괴되었을 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 단점을 보완할만한 방법으로 효소를 이용한 가수분해방법을 사용하였다.

효소적 가수분해방법의 장점

해조류에 함유되어있는 항산화물질들을 효과적으로 추출해내기 위해 효소적 가수분해방법을 이용하였다(24). 효소는 미생물 유래의 저렴하면서도 상업용으로 사용되어지고 있는 단백질 분해효소 5종(Alcalase, Flavourzyme, Kojizyme, Neutrase, Protamex)과 당 분해효소 5종(AMG, Celluclast, Termamyl, Ultraflo, Viscozyme)을 덴마크 Novozyme 사로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 이러한 효소들은 여러 가지 효소들이 복합되어진 multiple enzyme으로서 Fig. 1에서 보는 것처럼 cell wall에 있는 섬유질이나 당단백질 혹은 알긴산 고분자 물질 등을 분해시키는 작용을 하여 활성물질들이 원활히 추출될 수 있도록 유도해 주는 작용을 하였다. 이러한 효소적 가수분해물은 높은 수율을 바탕으로 한 수용성의 추출물이기 때문에 그들이 가지고 있는 생리활성을 식품의 첨가제 혹은 건강식품소재로 사용하여 생체 내에 쉽게 전달시킬 수 있고, 유기용매와 같은 화학약품을 사용하지 않았기 때문에 안전성에 대한 문제도 줄어들어 잠재적 천연항산화제로서의 역할을 할 수 있을 것이다. 따라서 이 연구의 목적은 청정해역을 바탕으로 한 제주지역에 널리 서식하고 있는 해조류로부터 효소적 수식의 과정을 통해 수용성 물질을 추출해 내고, 그것으로부터 항산화 활성을 검색하여 이것을 산업적으로 이용할 수 있도록 유도하는데 그 목적이 있다고 하겠다.

해조류의 효소적 가수분해물의 항산화 효과

유해산소 소거활성검색

생체 내에서 산화와 관련된 현상으로 세포막에 존재하는 지질은 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H_2O_2 등의 활성산소와 결합하여 과산화물을 만들고, 이들의 연속반응에 의하여 alchohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성함으로써 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다(25,26). 따라서 본 실험에서는 이러한 유해

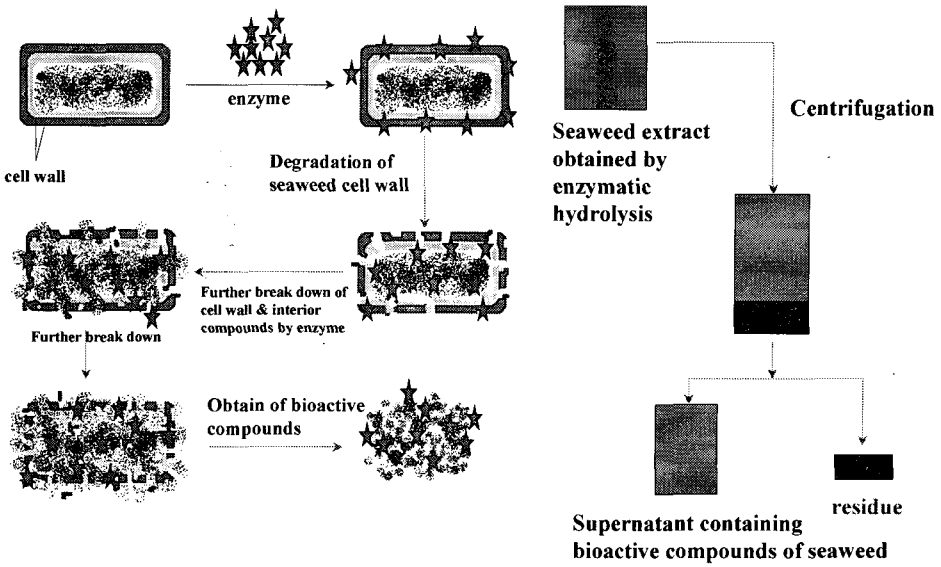

Fig. 1. Schematic diagram to explain enzymatic hydrolysis of seaweed.

산소인 superoxide anion radical, hydroxyl radical, DPPH free radical 및 H_2O_2의 소거활성을 측정하여 Table 1과 2에 나타내었다. 보는 것처럼 거의 대부분의 가수분해물에서 유해산소종 소거활성을 나타내었는데, 그 중에서 감태의 가수분해물은 약 60~90%의 우수한 hydrogen peroxide 소거활성을 나타내었다. 이러한 hydrogen peroxide는 체내 각 기관들의 DNA에 심각한 손상을 일으켜 각종 질병과 노화를 유발한다고 알려져 있다(27). 따라서 우리는 우수한 hydrogen peroxide활성을 나타내는 감태의 가수분해물을 가지고 뒤에 추가실험을 통해 세포손상 억제활성을 확인해 보았다. DPPH free radical에서도 60~70%의 우수한 소거 활성을 나타내었다. 이 수치는 현재 상용되어지고 있는 항산화제보다도 많게는 40%, 적게는 15% 높은 유해산소 소거율을 보였다. DPPH free radical에 대해서는 많은 연구들이 phenolic compound와의 긍정적 상관관계를 보고한 바 있다(23,28). 본 연구에서도 DPPH free radical과 total phenolic compound와의 상관관계를 비교해본 결과, DPPH free radical 소거활성이 높게 나타났던 감태의 효소적 가수분해물 뿐만 아니라 낮은 활성을 나타내었던 다른 가수분해물까지도 높은 페놀 함량을 나타낸 것을 확인하였다. 이것은 효소적 가수분해 방법에 의해 얻어진 추출물에 페놀성분 뿐만 아니라 다른 활성성분들이 항산화 효과에 영향을 끼친 것으로 보여진다. Superoxide anion radical 소거활성에서도 감태의 Termamyl 가수분해물에서 가장 우수한 활성을 나타내었고(약 67%), hydroxyl radical의 경우에는 모자반의 Acalase 가수분해물에서만 약 47%의 소거율을 나타내었으며, 나머지 가수분해물에서는 40% 미만의 낮은 소거율을 나타내었다. 이러한 해조류의 효소적 가수분해물에 대한 유해산소종들의 소거활성을 검색해 본 결과, 감태의 가수분해물에서 가장 우수한 활성을 나타내어, 감태의 효소적 가수분해물을 이용해서 electron spin resonance spectrophotometer (ESR) 실험과 DNA damage 그리고 cell 실험을 통해 감태의 효소적 가수분해물이 갖는 잠재적 항산화 효과를 확인해 보았다.

ESR을 통한 유해산소 소거활성 검색

ESR spectroscopy에 의한 측정방법은 가장 유망한 방법중의 하나로써, 방사선 조사시 입사된 에너지의 일부가 분자결합을 붕괴시켜 방출된 자유 라디칼이나 이온들을 측정할 수 있는 것으로 다른 방법들에 비해 시료준비가 간편하고 신속하며 시료에 손상을 주지 않는 검지기술로 알려져 있다(29,30). 이러한 장점에도 불구하고 국내에서는 유해산소의 검지방법으로 ESR spectroscopy를 이용한 연구는 많이 이루어지지는 않는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 감태의 효소적 가수분해물이 갖는 유해산소종 소거효능을 ESR spectroscopy를 이용해 다시 한번 증명해 보았다. Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성되는데, 이 alkyl radical 또한 ESR을 통해 쉽게 측정할 수 있다. ESR 분석을 통해 얻은 alkyl radical의 소거활성은 Fig. 2와 3에 나타내었다. 감태의 효소적 가수분해물은 alkyl radical 소거활성에서 또한 우수한 효과를 나타내었는데, 특히 AMG와 Celluclast 가수분해물의 경우에는 0.625 μg/mL의 낮은 농도에서도 80% 이상의 매우 뛰어난 효과를 갖는 것을 확인하였다. 또한 모든 가수분해물의 2.5 μg/mL 농도에서는 80% 이상의 뛰어난 alkyl radical 소거활성을 갖는 것을 보였고, 그래프 및 signal의 변화를 통해 농도에 의존적으로 radical

Table 1. Scavenging activities of reactive oxygen species and total phenolic contents of the extracts obtained by the carbohydratic hydrolyses of the brown seaweeds

Scientific name	Treated enzyme	% Inhibition				Tatal phenolics
		DPPH	O_2^-	HO$^\cdot$	H_2O_2	
Ecklonic cava	V	71.49±0.24	-7.14±0.23	16.45±2.25	87.94±0.04	1,352±0.7
	C	72.46±0.04	1.43±0.55	16.51±0.06	88.74±0.14	1,350±0.1
	AMG	70.17±0.24	-12.86±0.49	15.33±0.18	88.41±0.22	1,341±0.5
	T	42.90±0.20	67.14±1.26	16.33±0.36	72.97±0.63	1,162±0.2
	U	28.66±1.62	18.57±0.34	17.87±1.89	69.62±0.87	1,032±0.1
Ishige okamurae	V	15.98±1.03	28.57±0.78	20.06±0.06	39.52±5.41	273±0.1
	C	12.77±0.65	17.14±0.43	19.35±2.07	36.93±1.17	230±0.3
	AMG	12.40±1.29	28.57±0.23	19.35±1.60	40.46±5.73	226±0.1
	T	23.03±0.39	37.14±0.54	25.33±0.12	18.01±0.83	213±0.1
	U	-2.60±0.96	32.86±0.25	25.92±0.12	53.88±0.63	275±0.2
Sargassum fullvelum	V	4.40±2.12	44.29±1.12	29.05±1.72	37.76±0.61	257±0.2
	C	11.62±1.03	41.43±1.03	25.33±0.24	24.62±0.20	234±0.3
	AMG	3.34±2.48	41.43±0.48	27.57±0.59	28.89±0.23	263±0.3
	T	19.91±0.07	50.00±0.16	23.96±2.43	61.14±0.18	240±0.2
	U	-12.11±1.43	38.57±0.43	22.72±1.42	64.78±5.89	313±0.2
Sargassum horneri	V	-9.91±3.89	55.71±1.42	23.43±1.66	15.67±3.37	182±0.2
	C	-9.58±2.24	51.43±0.59	21.83±1.24	14.55±0.49	163±0.1
	AMG	-6.50±3.20	51.43±0.94	16.98±0.30	16.44±1.17	160±0.2
	T	11.18±0.87	58.57±0.31	24.08±3.02	90.88±0.38	272±0.3
	U	-13.58±1.16	48.57±0.76	23.67±0.36	92.69±0.65	384±0.2
Sargassum coreanum	V	38.41±2.17	8.57±0.34	12.37±0.53	76.90±0.72	1,123±0.7
	C	33.79±0.95	7.14±0.32	8.40±2.72	74.03±2.52	1,063±0.5
	AMG	32.56±0.69	-1.43±0.12	9.94±0.24	72.19±0.11	1,097±0.3
	T	37.15±0.75	5.71±0.22	13.20±3.24	68.48±2.25	945±0.4
	U	7.97±1.08	18.57±0.32	20.89±1.84	75.86±2.43	746±0.1
Sargassum thunbergii	V	9.70±1.36	41.43±0.49	33.37±1.66	40.59±2.36	386±0.5
	C	6.48±2.05	42.86±1.01	32.72±1.83	32.66±2.00	310±0.1
	AMG	8.41±1.75	40.00±0.06	26.98±1.54	32.84±0.70	352±0.4
	T	16.78±1.08	47.14±0.46	26.80±3.74	30.03±0.58	261±0.1
	U	-13.83±0.92	42.86±0.12	29.94±2.25	91.49±0.29	263±0.1
Sargassum lomentaria	V	-1.15±0.34	45.71±0.48	26.57±1.83	9.39±2.13	140±0.2
	C	-1.20±0.92	45.71±1.21	23.31±0.36	7.62±0.29	115±0.1
	AMG	-0.55±0.20	37.14±0.49	25.03±0.65	7.16±0.23	114±0.1
	T	16.00±1.13	47.14±0.96	26.09±3.14	10.79±2.18	115±0.1
	U	-14.29±0.49	41.43±1.04	31.07±1.72	14.84±3.73	149±0.1
α-Tocopherol		89.64±0.27	41.14±0.87	78.89±0.43	64.11±0.49	
BHA		87.38±1.32	34.84±0.13	56.36±1.12	67.37±1.08	
BHT		56.05±0.19	24.74±0.98	46.87±0.61	50.32±0.49	

V: Viscozyme L, C: Celluclast 1.5L FG, AMG: AMG 300L, T: Termamyl 120L, U: Ultrafol L.
O_2^-: Superoxide anion scavenging activity, HO$^\cdot$: Hydroxyl radical scavenging activity, H_2O_2: Hydrogen peroxide scavenging activity, DPPH: DPPH free radical sxavenging activity.

소거활성이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. ESR 기법을 사용한 여러 연구들이 우수한 라디칼 소거활성을 보고하고 있는데, Ahn 등(31)은 갈조류로부터 라디칼 소거활성을 측정한 결과 125 μg/mL의 농도에서 60% 이상의 alkyl radical 소거활성을 나타내었다고 보고하고 있다. Park 등(32) 또한 키토산을 농도별로 조제한 후 라디칼 소거활성을 확인한 결과 90% 키토산에서 70% 이상의 alkyl radical 소거활성을 나타낸다고 보고하였다.

DNA 손상 억제활성 검색

세포 내 DNA의 손상정도를 알아보기 위해 최근까지 널리 쓰이고 있는 여러 가지 방법들은 유해한 독성물질에 의한 유전독성의 발생여부를 알아내는 좋은 수단일 뿐만 아니라 암과 같은 퇴행성 만성질환의 여부를 조기에 판단할 수 있는 방법으로 알려져 있다(27). 따라서 본 실험에서는 세포의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 comet assay를 이용하여 감태의 효소적 가수분해물이 갖는 DNA 손상

Table 2. Scavenging activities of reactive oxygen species and total phenolic contents of the extracts obtained by the proteolytic hydrolyses of the brown seaweeds

Scientific name	Treated enzyme	% Inhibition				Total phenolics
		DPPH	O_2^-	$HO^·$	H_2O_2	
Ecklonia cava	P	68.16±0.09	31.43±0.98	15.09±0.41	77.99±0.49	1245±0.5
	K	66.49±0.47	-12.86±0.49	13.37±0.59	71.03±0.47	1216±0.6
	N	66.64±0.36	-4.29±0.25	12.43±1.78	76.09±0.59	1234±0.3
	F	32.64±0.43	15.71±0.43	17.28±1.54	62.75±0.02	1087±0.3
	A	2.61±0.56	1.43±0.17	17.16±0.47	64.31±1.14	1095±0.4
Ishige okamurae	P	9.70±0.69	34.29±0.78	29.47±3.20	93.70±0.29	236±0.1
	K	24.21±0.26	37.14±0.46	28.99±1.78	96.27±0.22	169±0.1
	N	25.42±0.50	24.29±0.12	25.15±0.53	43.13±6.11	248±0.3
	F	-5.06±2.85	5.71±0.23	31.83±0.59	93.41±0.11	283±0.2
	A	-13.50±1.25	-8.57±0.03	32.96±0.30	91.62±0.13	420±0.5
Sargassum fullvelum	P	20.14±1.25	42.86±0.49	23.91±0.36	91.02±0.11	235±0.3
	K	20.45±0.39	47.14±0.34	22.54±0.77	30.49±1.24	193±0.1
	N	20.42±0.56	48.57±1.09	24.32±0.30	33.20±1.68	225±0.2
	F	-10.90±3.84	51.43±0.89	38.88±1.12	79.86±2.49	224±0.3
	A	-12.87±1.88	31.43±0.34	46.92±0.35	75.36±4.96	366±0.4
Sargassum horneri	P	9.44±1.02	54.29±0.16	23.55±1.66	31.14±3.70	245±0.5
	K	8.26±2.05	52.86±0.73	18.28±1.95	28.91±1.15	199±0.1
	N	11.70±0.77	52.86±0.11	19.41±1.78	30.90±3.68	256±0.2
	F	-13.68±1.06	52.86±0.45	19.70±0.53	60.47±7.30	317±0.4
	A	-10.41±3.82	37.14±0.32	20.71±2.13	88.09±0.87	533±0.3
Sargassum coreamum	P	37.98±0.95	1.43±0.11	15.03±1.07	68.53±1.80	996±0.3
	K	40.62±0.82	4.29±0.23	17.51±2.01	68.55±1.60	994±0.3
	N	40.56±0.77	2.86±0.13	12.43±1.66	69.16±2.40	957±0.6
	F	11.56±0.30	-20.00±0.45	21.83±3.37	76.19±1.64	815±0.1
	A	-14.59±0.19	-58.57±0.81	21.54±1.78	77.64±0.27	961±0.8
Sargassum thunbergii	P	23.12±2.32	47.14±0.75	30.30±1.42	75.39±0.31	296±0.1
	K	20.71±0.19	45.71±0.65	28.93±2.07	76.55±1.50	238±0.3
	N	20.14±0.59	47.14±0.97	29.70±2.49	79.97±1.77	272±0.4
	F	-14.54±0.20	47.14±0.78	30.41±1.89	93.37±0.25	253±0.1
	A	-12.92±1.82	28.57±0.65	29.11±2.01	92.58±0.04	416±0.2
Scytosipon lomentaria	P	17.84±0.36	47.14±0.97	27.46±1.54	6.75±3.68	125±0.1
	K	19.33±0.49	48.57±0.31	26.21±2.74	7.07±3.14	112±0.2
	N	18.70±0.55	47.14±0.36	23.91±0.83	14.24±1.44	138±0.1
	F	-13.60±1.15	34.29±0.42	28.88±0.83	30.34±4.06	140±0.2
	A	-9.14±3.23	34.29±0.12	26.57±2.90	39.90±5.53	207±0.2
α-Tocopherol		89.64±0.27	41.14±0.87	78.89±0.43	64.11±0.49	
BHA		87.38±1.32	34.84±0.13	56.36±1.12	67.37±1.08	
BHT		56.05±0.19	24.74±0.98	46.87±0.61	50.32±0.49	

P: Protamex, K: Kojizyme 500 MG, N: Neutrase 0.8L, F: Flavourzyme 500 MG, A: Alcalase 2.4L FG.
O_2^-: Superoxide anion scavenging activity, $HO^·$: Hydroxyl radical scavenging activity, H_2O_2: Hydrogen peroxide scavenging activity, DPPH: DPPH free radical sxavenging activity.

억제활성을 분석하였다. 이 방법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후 전기영동을 하게 되면 DNA 분자량의 크기가 작을 수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을 수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다(33). 이러한 tail movement를 측정하여 DNA 손상 억제효과를 나타내게 된다. 모든 가수분해물의 50 μg/mL의 농도에서 50% 이상의 우수한 DNA 손상 억제활성을 나타내었는데 그 중에서 가장 우수한 효과를 보였던 Ultraflo 가수분해물과 Alcalase 가수분해물의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 두 가수분해물 모두 농도에 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고 1 μg/mL의 낮은 농도에서도 약 50%의 높은 효과를 보였다. 특히 Ultraflo 가수분해물의 경우 50 μg/mL의 농도에서 약 90%의 DNA 손상 억제활성을 나타내었다. Fig. 5는 이러한 결과를 한눈에 볼 수

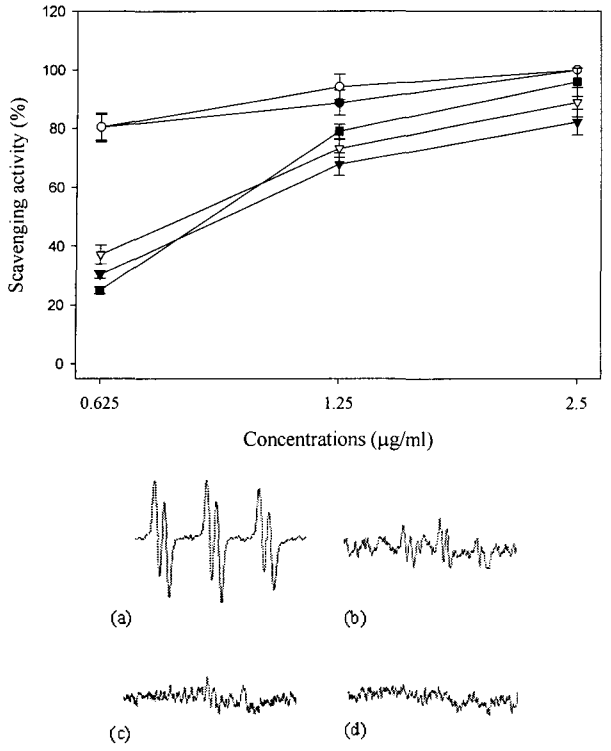

Fig. 2. Alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates from *E. cava* by various carbohydrases.
●, AMG hydrolysate; ○, Celluclast hydrolysate; ▼, Termamyl hydrolysate; ▽, Ultraflo hydrolysate; ■, Viscozyme hydrolysate. Mean±SE of determinations was made in triplicate experiments.

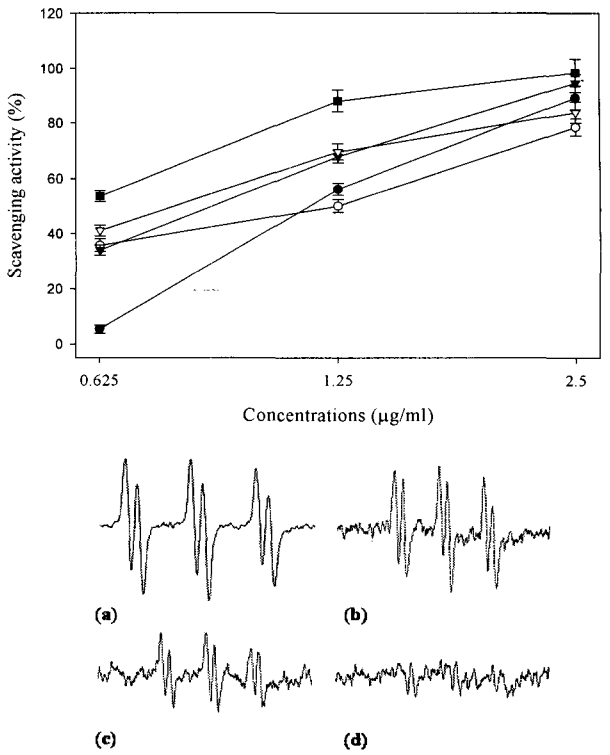

Fig. 3. Alkyl radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates from *E. cava* by various proteases.
●, Alcalase hydrolysate; ○, Flavourzyme hydrolysate; ▼, Kojizyme hydrolysate; ▽, Neutrase hydrolysate; ■, Protamex hydrolysate. Mean±SE of determinations was made in triplicate experiments.

있는 사진으로, 아무 손상도 받지 않은 A에 비해 과산화수소에 의해 손상을 받은 B에서는 대부분의 DNA가 손상되어 형태도 남지 않은 것을 볼 수 있다. 그러나 감태의 가수분해물을 농도별로 처리해 주었을 때는 농도에 의존적으로 DNA의 손상이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 현재까지 comet assay를 이용하여 DNA 손상 억제효과를 확인한 연구는 많았지만 해조류를 대상으로 확인한 결과는 그리 많지 않았다. 따라서 다양한 해조류들을 screening해서 우수한 DNA 손상 억제활성을 나타내는 개체를 선정한 후 임상에 적용시킬 수 있다면 잠재적 의약품소재로서의 가능성이 충분하다고 여겨진다.

Cell 실험을 통한 효소적 가수분해물의 항산화효과 검색

국소적으로 발생한 과잉의 활성산소들이 충분히 소실되지 않으면 이들은 반응성이 높기 때문에 쉽사리 산화되는 지질이나 단백질, 핵산 등과 같은 생체 성분과 반응하여 다양한 상해를 일으키는 것으로 알려져 있다(34,35). 본 연구에서는 화학적 분석을 통해 우수한 활성을 나타내었던 감태의 효소적 가수분해물이 cell상에서는 어떠한 효과를 나타내는지 알아보기 위해, normal cell인 V79-4 cell을 이용해 DCF-DA 방법으로 항산화 활성을 측정하였다. 이 방법은 세포 내에서 H_2O_2를 측정하기 위한 fluormetric 분석법으로서 비형광 물질인 dichlorodihydrofluorescin diacetate(DCHF-DA)가 세포내에 들어가 esterase효소에 의해 dichlorodihydrofluorescin(DCHF)로 변환되고 다시 세포내 H_2O_2와 반응하여 dichlorofluorescin(DCF)로 산화되면서 발색되는 형광정도를 측정함으로써 H_2O_2의 소거활성을 나타내는 방법이다(36,37). 실험은 H_2O_2 소거활성이 가장 우수하게 나타났던 감태의 Celluclast 가수분해물을 이용하여 우수한 활성을 갖는 물질이 어느 부분에 함유되었는지 알아보기 위해, Fig. 6에서 보이는 membrane을 이용하여 분자량별로 분획한 후 각각의 hydrogen peroxide 소거활성을 비교해 보았다. Fig. 7에서 보는 것처럼 분획하지 않은 원시료(unfractionated), 1 kDa 미만(<1 kDa), 1~10 kDa, 10~30 kDa, 30 kDa 이상(>30 kDa)의 분획물을 대상으로 실험하였다. 농도에 의존적으로 소거활성이 증가되는 경향을 나타내었고, 100 μg/mL 농도로 시료를 처리하였을 때는 1~10 kDa, 10~30 kDa, >30 kDa의 경우 80% 이상의 우수한 효과를 나타내었다. 특히 >30 kDa의 분자량을 갖는 분획물의 경우에는 낮은 농도인 1 μg/mL에서도 약 70%의 우수한 소거활성을 나타내었다. 또한 H_2O_2 손상에 대한 감태 가수분해물의 cell viability는

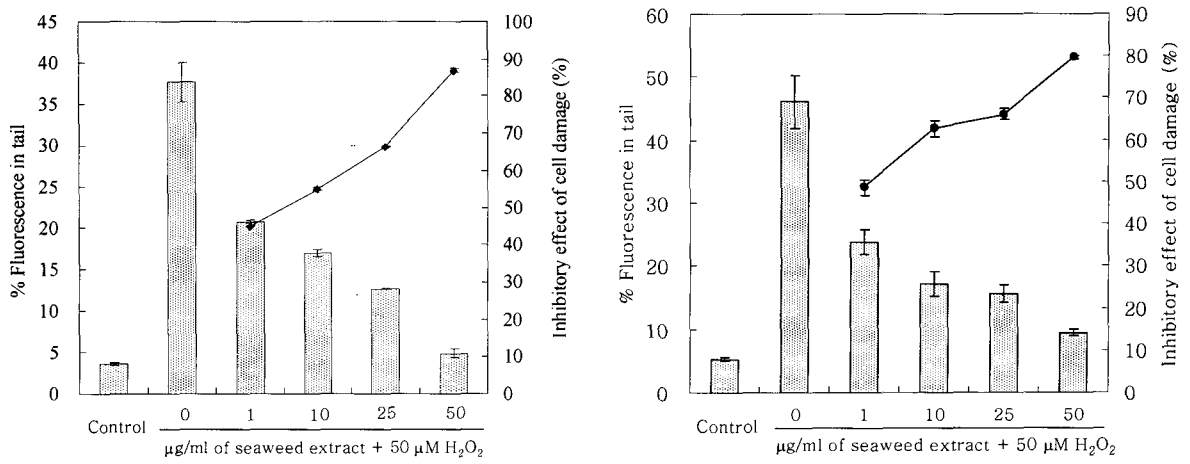

Fig. 4. The effect of supplementation *in vitro* with different concentration of *E. cava* Ultraflo and Alcalase extract on H_2O_2-induced human lymphocytes DNA damage.

Values are mean with standard error of duplicate experiments with lymphocytes from each of two different donors. Significant different to values for samples treated with 50 μM H_2O_2 only using LSD.

▨: % Fluorescence in tail, —●—: Inhibitory effect of cell damage.

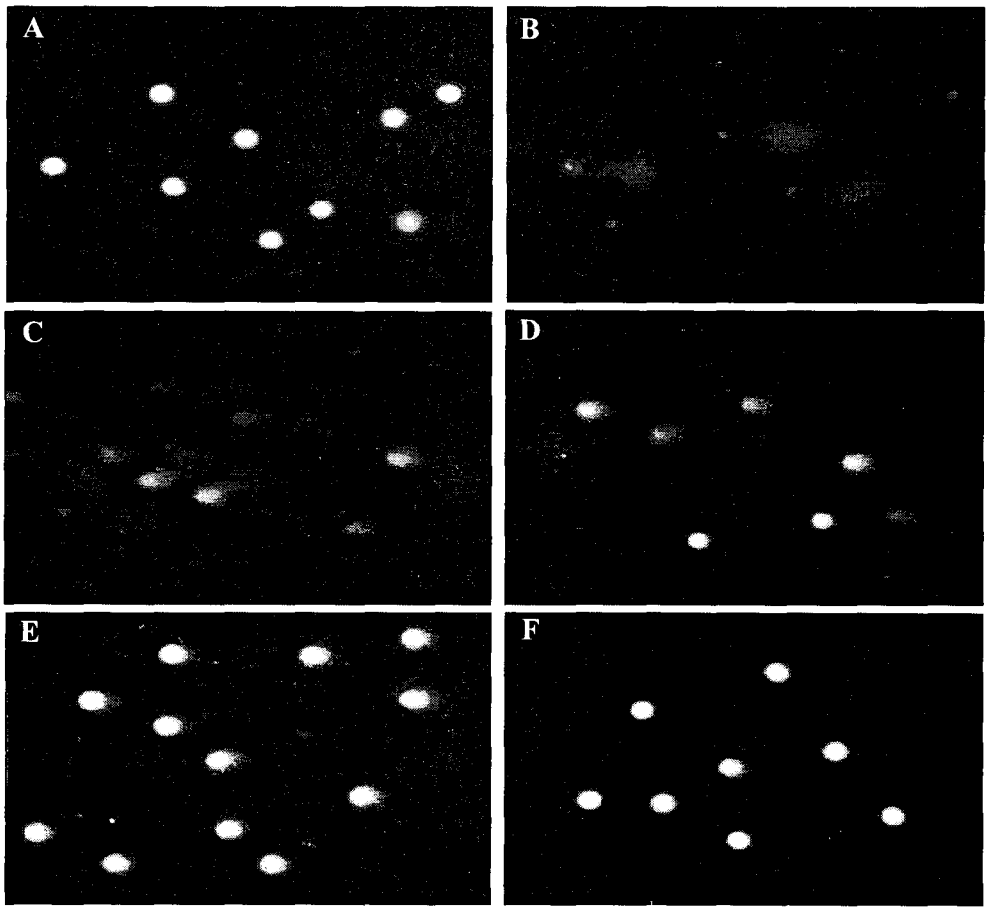

Fig. 5. Comet images of human lymphocytes.

(A) negative control; (B) lymphocytes treated with 50 μM H_2O_2; (C) lymphocytes treated with 1 μg/mL *E. cava* Ultraflo hydrolysate+50 μM H_2O_2; (D) lymphocytes treated with 10 μg/mL *E. cava* Ultraflo hydrolysate+50 μM H_2O_2; (E) lymphocytes treated with 25 μg/mL *E. cava* Ultraflo hydrolysate+50 μM H_2O_2; (F) lymphocytes treated with 50 μg/mL *E. cava* Ultraflo hydrolysate+50 μM H_2O_2.

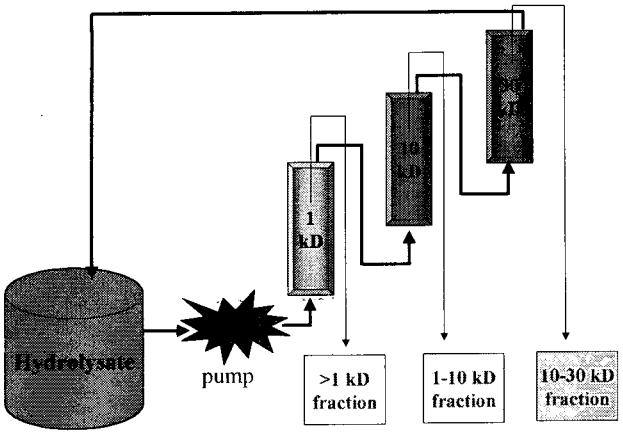

Fig. 6. Ultrafiltration membrane system for fractionation of *E. cava* hydrolysates according to molecular weights of constituents.

MTT 방법으로 측정하였다. 이것은 살아있는 세포의 경우 노란색의 수용성 MTT 시약이 미토콘드리아의 탈수소효소 작용에 의해 자주색으로 환원되는 정도를 흡광도를 측정함으로써 알아보는 방법이다(38). Fig. 8에서 보는 것처럼 낮은 농도로 시료를 처리했을 때에는 그리 큰 차이를 나타내지 않았으나 농도를 높여줄수록 세포의 생존률에도 변화가 나타났다. 100 μg/mL의 농도에서는 분획하지 않은 원시료와 <1 kDa 그리고 >30 kDa의 분획물에서 50% 이상의 세포손상의 보호효과를 나타내었고, 이 실험에서 또한 30 kDa 이상의 분획에서 약 70%의 우수한 세포보호효과를 가지는 것을 확인하였다. 따라서 30 kDa 이상의 시료가 갖는 세포 보호효과를 증명하기 위해 현미경적 관찰을 시도하였다. 이것은 유해 산소 종에 의한 세포 손상 정도를 Hoechst 33342 형광 염색약으로 핵을 염색하여 핵의 손상정도를 형광 현미경으로 관찰하는 방법으로써, cell에 H_2O_2를 첨가시키지 않았을 때, cell에 H_2O_2로 손상을 가해주었을 때, 그리고 cell에 감태의 가수분해물을 처리해 준 후 H_2O_2로 손상을 가해준 세 가지의 처리 군으로 나누어 형태적 관찰을 실시하여 Fig. 9에 나타내었다. H_2O_2를 첨가하지 않은 (a)의 경우에는 cell의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만, H_2O_2를 첨가시킨 (b)의 경우에는 cell의 형태가 많이 깨져서 apoptotic body가 많이 보이고 있으며 cell의 형태 또한 뚜렷하지가 않았다. 하지만 감태 가수분해물을 첨가시킨 (c)의 경우에는 H_2O_2를 첨가하지 않았던 (a)에서처럼 cell의 형태를 뚜렷하게 확인할 수 있었고 가수분해물이 가지고 있는 세포보호 효과로 인해 손상을 거의 입지 않은 것을 확인할 수 있었다. 감태의 효소적 가수분해물이 갖는 cell protective effect는 flow cytometry를 이용하여 다시 한번 확인할 수 있었다. 세포 수준에서 apoptosis를 가장 정확하게 정량할 수 있는 방법은 세포 DNA를 형광 물질로 염색한 후 flow cytometry로 분석하는 것이다. 이것은 세포 또는 염색체 등의 세포성분을 부유 상태로 유체계 속을 고속으로 통과시키고 여기에 레이저를 부딪혀 발생되는 빛의 산란과 형광물질의 발광현상을 이용하여 세포에 관한 여러 가지 정보를

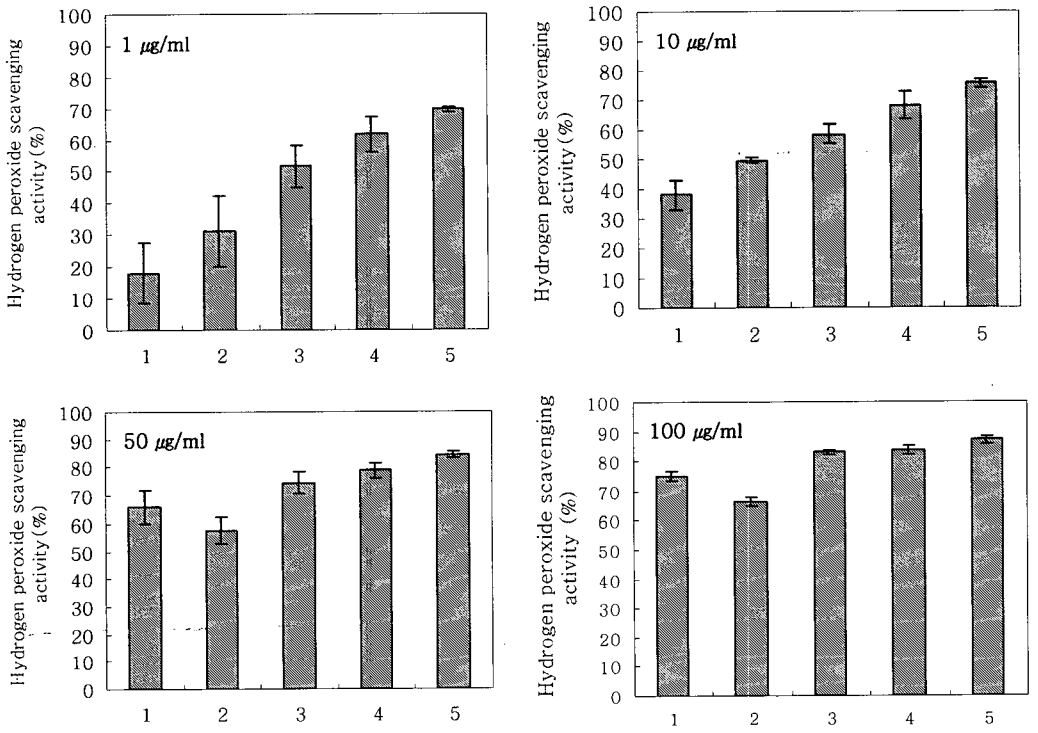

Fig. 7. Hydrogen peroxide scavenging activities of the *E. cava* Celluclast hydrolysate by DCF-DA on V79-4 cells.

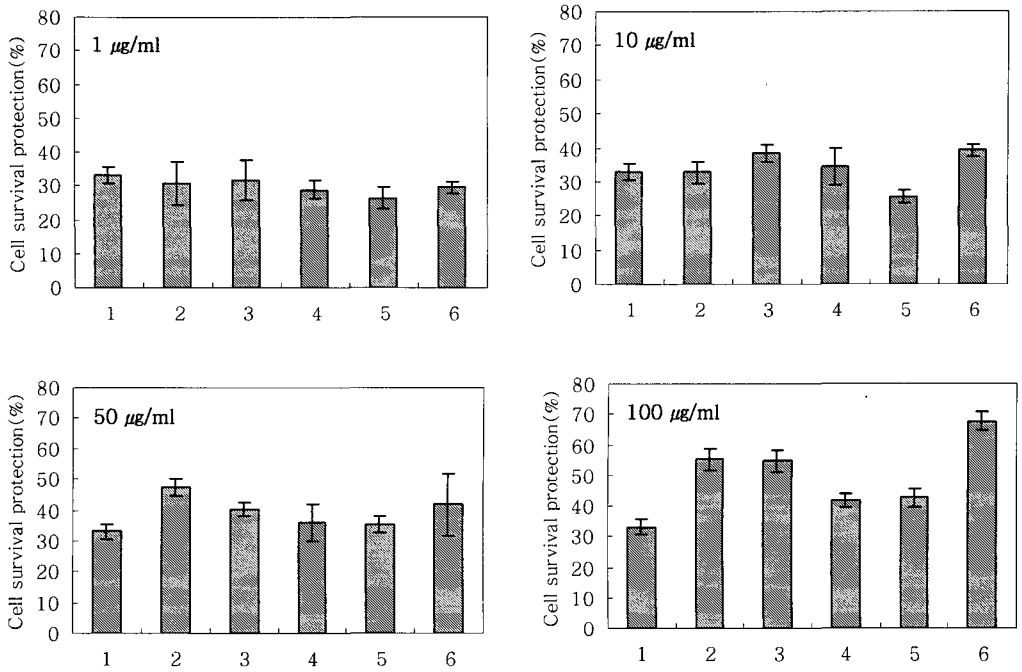

Fig. 8. Protective effect of the *E. cava* Celluclast hydrolysate on H_2O_2-induced oxidative damage of V79-4 cells.

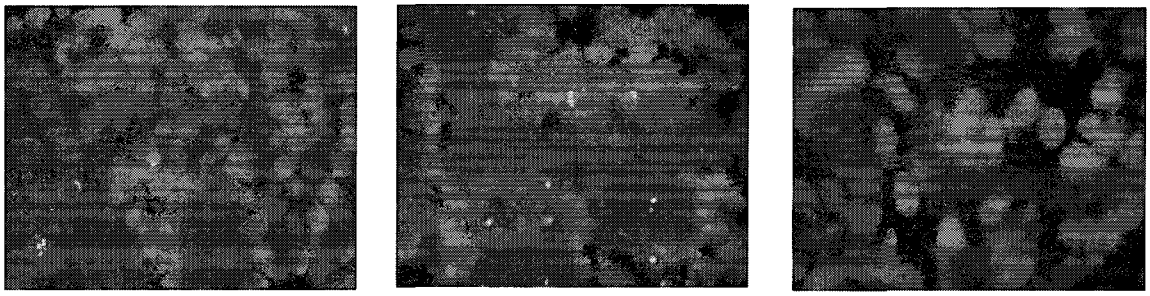

Fig. 9. H_2O_2-induced morphological changes on V79-4 cells and its significant inhibition by>30 kDa fraction of the *E. cava* Celluclast hydrolysate.
(a) Control, (b) Cell+H_2O_2, (c) Cell+H_2O_2+extract.

측정하는 것으로, 본 실험에서는 감태의 가수분해물에 의해 세포들이 H_2O_2의 손상에 대항해 얼마만큼 효과적으로 보호되었는지 확인하였다. Fig. 10은 flow cytometry를 이용해 측정한 결과를 나타내는 것으로, 그림에 보이는 peak들은 cell cycle을 의미하는 것이다. Cell cycle은 한 세포가 성장하여 분열되는 과정으로 S기(DNA replication)를 시

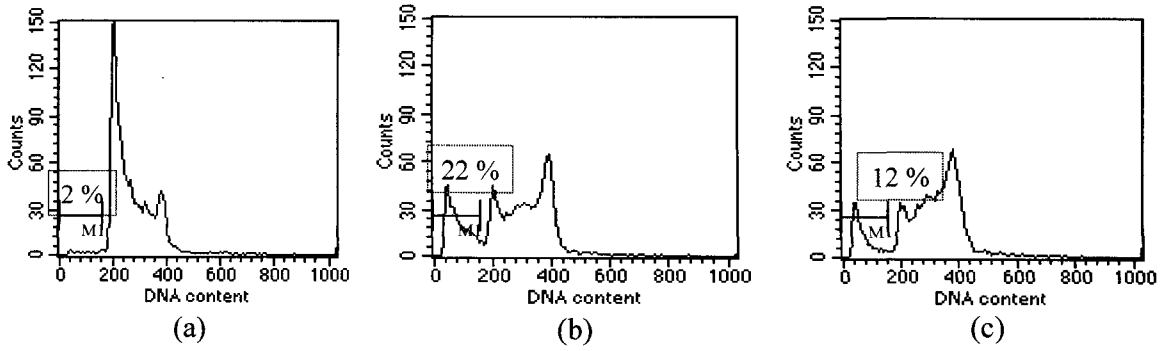

Fig. 10. The apoptotic sub-G1 DNA content in V79-4 cells treated with H_2O_2.

작으로 하여 G2기(휴지기), M기(유사분열과 세포질 분리), G1기(휴지기)를 거친 후 다시 S기로 이어지는 4단계로 나누어지는데, cell에 apoptosis가 유발되게 되면 replication이 멈추고 cell의 고사가 일어나 flow cytometry로 측정하였을 때 M1부분에 보이는 것처럼 고사된 부분이 증가한 것을 확인할 수 있다. 그림에서 보는 것처럼 H_2O_2만을 첨가했을 경우에는 22%의 apoptosis를 유발한 반면에, 감태의 가수분해물을 첨가시켰을 경우에는 apoptosis의 유발이 효과적으로 억제되었다는 것을 확인할 수 있었다.

현재까지 해조류로부터 항산화 효과를 보고한 연구들은 많았지만, 이렇게 다양한 방법으로 스크리닝하고 그들의 효과를 나타낸 연구는 그리 많지 않다. 또한 이전까지의 연구들은 fucoxanthin, phlorotanin 등과 같은 pigment나 polyphenol계열의 저분자 물질들을 대상으로한 연구가 주를 이루었다. 하지만 본 연구에서는 전체적으로 모든 분획에서 우수한 활성을 보였지만 그중 30 kDa 이상의 분자량을 가진 분획물에서 가장 뛰어난 항산화 효과 및 세포손상 억제효과를 나타내었다. 이것은 효소적 가수분해방법에 의해 얻어진 가수분해물이 fucoidan이나 alginate와 같은 고분자 다당류 혹은 단백질과 같은 거대분자를 갖는 물질들이거나, 혹은 항산화 효과를 나타내는 작은 분자의 물질들이 이러한 거대분자들과 binding하여 나타나는 결과로 볼 수도 있기 때문에 이러한 물질들을 체계적이고도 효과적으로 분리할 수 있는 연구가 수행되어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Yagi K. 1987. Lipid peroxides and human disease. *Chem Phys Lipids* 45: 337-341.
2. Lopaczyski W, Zeisel SH. 2001. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr Res* 21: 295-307.
3. Yu BP. 1994. Cellular defense against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
4. Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J. 1997. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species-implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med* 22: 151-159.
5. Chung SR, So MS, Jeune KH. 1991. Studies on bioactive marine natural substance, lectins. Marine animal lectins (XII). Invited lecture of international congress of new drug development, Pharm Soc Kor. p 345.
6. Li X, Li Y, Jeong JH, Lee KT, Choi HD, Son BW. 2003. Screening of tyrosinase inhibiting activity from the marine-derived fungus. *Kor J Pharmacogn* 34: 138-141.
7. Lee HJ, Park KE, Yoo JS, Ahn JW, Lee BJ, Seo Y. 2004. Studies on screening of seaweed extracts for peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities. *Ocean Polar Res* 26: 59-64.
8. Dykens JA, Shick JM, Benoit C, Buettner GR, Winston GW. 1992. Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. *J Exp Biol* 168: 219-241.
9. Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemoth* 50: 889-893.
10. Okai Y, Higashi-Okai K, Ishizaka S, Ohtani K, Matsui-Yuasa I, Yamashita U. 1998. Possible immunodulating activities in an extract of edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (Hijiki). *J Sci Food Agric* 76: 56-62.
11. Chen CY, Chou HN. 2002. Screening of red algae filaments as a potential alternative source of eicosapentaenoic acid. *Mar Biotechnol* 4: 189-192.
12. Frlich I, Riederer P. 1995. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidant treatment. *Drug Res* 45: 443-449.
13. Ahn MJ, Yoon KD, Kim CY, Min SY, Kim YU, Kim HJ, Kim JH, Shin CG, Lee CK, Kim TG, Kim SH, Huh H, Kim J. 2003. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and activiral activity of Korean seaweed extracts. *J Appl Phycol* 14: 325-329.
14. Fujimoto K, Kaneda T. 1980. Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Bull Jap Soc Sci Fish* 46: 1125-1130.
15. Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci* 73: 167-179.
16. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
17. Srivastava RC, Husain MM, Hasan SK, Athar M. 2000. Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett* 153: 1-5.
18. Kaneda T, Ando H. 1971. Component lipids of purple laver and their antioxigenic activity. *Proc Int Seaweed Symp* 7: 553-557.
19. Yan XJ, Li XC, Zhou CX, Fan X. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J Appl Phycol* 8: 201-203.
20. Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 605-607.
21. Estrada JEP, Bescós PB, Fresno AMV. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56: 497-500.
22. Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Kor J Food Sci Technol* 23: 256-261.
23. 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.
24. Heo SJ, Jeon YJ, Lee JH, Kim HT, Lee KW. 2003. Antioxidant effect of enzymatic hydrolysate from a Kelp, *Ecklonia cava*. *Algae* 18: 341-347.
25. Kovatcheva EG, Koleva II, Ilieva M, Pavlov A, Mincheva M, Konushlieva M. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell culture. *Food Chem* 7: 1069-1077.
26. Ruberto G, Baratta MT, Biondi DM, Amico V. 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *J Appl Phycol* 13: 403-407.
27. Park EJ, Kang MH. 2002. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Kor J Nutr* 35: 213-222.
28. 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.
29. Janzen EG, Towner DL, Haire DL. 1987. Detection of free radical generated from the *in vitro* metabolism of carbon tetrachloride using improved ESR spin trapping techniques. *Free Radical Res Commun* 3: 357-364.
30. Kadiiska MB, Mason RP. 2002. *In vivo* copper-mediate free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A* 58: 1227-1239.
31. Ahn CB, Jeon YJ, Kang DS, Shin TS, Jung BM. 2004. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. *Food Res Int* 37: 253-258.
32. Park PJ, Je JY, Kim SK. 2004. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohyd Polym* 55: 17-22.
33. Kang MH. 2003. Green vegetable juice reduces *in vitro* and *in vivo* DNA damage and plasma lipid concentrations. *Food Ind Nutr* 8: 8-14.
34. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. 2000. Free radical and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148: 187-197.
35. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL. 1990. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 237: 123-130.
36. Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxinitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145-157.
37. Wang H, Joseph J. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612-616.
38. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47: 943-946.