

방사선 조사에 의한 문어 자숙액의 항산화 활성 증가 원인 규명 - 연구노트 -

최종일¹ · 김연주¹ · 성낙운¹ · 김재훈¹ · 안동현² · 전병수² · 조국연³ · 변명우¹ · 이주운^{1*}

¹한국원자력연구원 정음방사선과학연구소

²부경대학교 식품생명공학부

³서울벤처정보대학원대학교

Investigation on the Increase of Antioxidant Activity of Cooking Drip from *Enteroctopus dofleini* by Irradiation

Jong-il Choi¹, Yeon-Joo Kim¹, Nak-Yun Sung¹, Jae-Hun Kim¹, Dong-Hyun Ahn²,
Byung-Soo Chun², Kook Yeon Cho³, Myung-Woo Byun¹, and Ju-Woon Lee^{1*}

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

²Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

³Seoul University of Venture & Information, Seoul 135-090, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the reason for the increase in the antioxidant activity of cooking drip from *Enteroctopus dofleini* by gamma and electron-beam irradiation. To define the effect of irradiation on the antioxidant activity of polyphenol in cooking drip, polyphenol excluded cooking drip extracts were prepared with polyclarTM. But, the antioxidant activity of the cooking drip extracts without polyphenol was still increased by both irradiations. Instead, the effect on the proteins in the cooking drips prepared by ammonium sulfate precipitation showed great increase in antioxidative activity by irradiation. From these results, it was concluded that the increase in the antioxidative activity in cooking drips by the irradiation was caused by the structural modification of proteins in the cooking drips.

Key words: antioxidant activity, cooking drips, irradiation, polyphenol, protein

서 론

경제 성장과 국민 소득의 증대로 건강과 장수에 대한 관심이 높아짐에 따라 항산화, 항암 및 면역 증가 등의 생리활성을 갖는 천연식품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이중 항산화성은 활성산소에 의한 세포 노화의 방지 역할로 많은 관심을 끌고 있으며, 많은 천연 및 합성 항산화제들이 개발되고 있다. 천연식품 중에서 널리 분포하고 있는 대표적인 항산화 성분인 페놀 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 특히 phenolics hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 자유라디칼을 소거하는 기능, 활성산소 및 질소종의 반응을 억제함으로써 항산화 활성 뿐 아니라 다양한 생리작용과 효능을 가진다(1). 또한 세포내에 존재하는 다양한 항산화 단백질은 세포의 대사 과정에서 생성된 ROS(reactive oxygen species)와 결합함으로써 항산화 작용을 일으킨다(2).

수산가공공정에서 발생하는 부산물 중에서 자숙액은 주로 문어, 참치, 고등어, 굴, 오징어, 멸치 및 해조류 등과 같은 통조림 및 건제품 가공공정에서 발생되며, 이들 대부분은

폐기물로 처리되고 일부만 저가의 조미료 재료나 식품중간 소재로 이용되고 있어(3,4), 경제적 손실이 커지고 있다. 하지만, 최근의 연구에서 수산 자숙액에 다양한 기능성들이 보고되고 있으며(5,6), 특히 자숙액 내의 항산화능은 감마선, 전자선과 같은 방사선 조사에 의하여 증가한다는 것이 밝혀졌다(7,8).

방사선 조사는 식품의 영양적인 측면과 관능적 특성의 변화 없이 병원성 미생물과 부패 미생물을 제거하는 가장 좋은 방법으로 알려져 있으며 그 이용이 세계적으로 확대되고 있다(9). 최근 감마선 조사로 인한 식품성분의 생리활성변화에 대한 연구 또한 활발히 이루어지고 있으며, *Antrodia camphorata*(10), 대두(11), 아몬드 껍질(12), 로즈마리(13), 녹차 잎(14) 등의 항산화 활성에 감마선이 다양한 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 하지만 자숙액과 같은 천연 추출물의 방사선 조사에 의한 항산화성의 증가에 대한 원인 규명에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 논문에서는 수산 가공 폐액인 문어 자숙액을 식품 소재로 이용하기 위하여 방사선 조사한 결과 문어 자숙액

*Corresponding author. E-mail: sjwlee@kaeri.re.kr
Phone: 82-63-570-3204, Fax: 82-63-570-3207

추출물의 항산화 활성이 증진된 이전의 연구 결과(7,8)로부터, 문어 자숙액 추출물의 항산화 활성 증가 요인이 무엇인지를 알아보고자 연구를 실시하였다. 천연물의 항산화 성분으로 잘 알려져 있는 폴리페놀과 단백질 각각의 성분들에 대하여 방사선 조사에 의한 항산화능에 관한 영향을 연구하여 방사선 조사에 의한 자숙액의 항산화능 증가 원인을 규명하였다.

재료 및 방법

시료 준비

본 연구에서 사용한 문어 자숙액은 부산 사하구 소재 우영수산에서 제공받았다. 시료 내의 불순물을 제거하기 위하여 에탄올을 70%로 제조하여 시료와 70% 에탄올을 1:3 비율로 희석한 후 간헐적으로 흔들어 추출하였다. 추출물은 Whatman filter paper No. 4(Whatman International Ltd., Springfield Mill, Kent, England)로 여과하여 4°C에 보관하여 이후의 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 시약들은 모두 ACS reagent 이상의 등급을 사용하였다.

폴리페놀 흡착

자숙액 에탄올 추출물에 폴리페놀 성분을 제거하기 위하여 polyclar™를 이용한 polyphenol의 흡착 방법을 사용하였다(15). 10 mL의 자숙액 추출물에 Polyclar-10(ISP Asia Pacific Pte Ltd., Singapore)를 1 g 첨가하여 70°C에서 1시간 가열한 후 Whatman filter paper No. 4(Whatman)로 여과하여 사용하였다.

단백질 침전

문어 자숙액 1 L에 (NH₄)₂SO₄를 70%까지 교반하며 넣은 후 2시간 동안 4°C에 보관하여 단백질을 침전시킨 후 원심분리(3,000 rpm, 20분)하여 상등액을 제거하여 단백질 침전물을 분리하였다(16). 이를 500 Da 크기의 membrane인 Cellulose Ester Dialysis Membranes(Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA)를 이용하여 투석하여 (NH₄)₂SO₄를 제거하였다. 분리한 단백질은 동결건조 후 1 g/L의 농도로 증류수에 녹여 향 후 실험에 사용하였다.

방사선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소(Jeongeup, Korea) 내 선원 11.1 PBq, Co-60 감마선 조사시설(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co., Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하여 실온(14±1°C)에서 시간당 10 kGy의 선량율로 각각 0, 10 및 50 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter(5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다. 문어 자숙액 추출물과 단

백질 추출 용액은 screw-bottle에 밀봉하여 조사하였으며, 조사 후 4°C에 보관하여 향후의 실험에 사용하였다.

전자선 조사는 electron-beam accelerator(model ELV-8, 2.5 MeV, Eb-Tech, Daejeon, Korea)를 이용하였다. Low density polyethylene bag에 문어 자숙액 추출물 또는 단백질 추출 용액을 넣어 3 mm 이하의 두께가 되도록 포장한 다음, 가속 전류 5 mA, velocity 10 m/min의 선량률로 총 흡수선량이 0, 10 및 50 kGy가 되도록 조사하였다. 이때의 흡수선량은 cellulose triacetate dosimeter로 확인하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

문어 자숙액 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법(17)을 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL에 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL을 넣고 교반한 후 30분 동안 실온에 정치한 다음 반응용액을 분광광도계(UV 1600 PC, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 계산식에 의해 환산되었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

상대 라디칼 소거능(relative antioxidant activity)는 비조사구에 대한 조사구의 DPPH 라디칼 소거능의 백분율로 나타내었다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SPSS software(18)에서 프로그램에 의한 ANOVA test를 이용하여 분산분석을 한 후 Duncan의 다중위검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

폴리페놀을 제거한 자숙액 추출물의 방사선 조사에 의한 항산화 활성 영향

문어 자숙액 에탄올 추출물에 감마선 조사한 결과 Kim 등(7)은 DPPH 라디칼 소거능이 조사선량이 증가함에 따라 10.6%까지 증가하였으며, 총 페놀 함량은 조사선량이 증가함에 따라 406.32 ppm에서 476.25 ppm으로 증가하였다고 보고하였다. 또한 이와 유사하게 문어 자숙액 에탄올 추출물에 전자선을 조사한 결과에서도 비조사구에 비하여 조사구에서 DPPH 라디칼 소거능이 8% 증가하였으며, 총 페놀 함량은 402.75 ppm에서 472.62 ppm으로 증가하였다(8). Shahidi와 Wanasundara(19)는 다양한 페놀 화합물은 수산기를 통한 수소 공여와 페놀 고리 구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Kwon 등(20)은 소목의 구성성분 중 다양한 페놀성 화합물과 플라보

노이드의 배당체들이 방사선 조사에 의해 이탈됨에 따라 페놀 함량이 증가하여 항산화 활성이 향상되었다고 하였다. Kahols 등(21)은 차가버섯 내의 다중 결합의 폴리페놀이 저분자로 분해되면서 항산화능이 증가하였다고 보고하였다.

따라서 문어 자숙액 에탄올 추출물에 방사선 조사한 결과 얻어진 항산화능 증가의 원인이 폴리페놀 함량의 증가에 있는 것으로 예측되어, polyclar를 이용하여 문어 자숙액 내의 폴리페놀을 흡착하여 제거한 자숙액 추출물의 방사선 조사 전후의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 감마선의 경우 10 및 50 kGy에서 비조사구보다 5.55% 및 10.96%의 항산화능이 증가하였고, 전자선의 경우 10 및 50 kGy에서 비조사구보다 3.21% 및 9.14%의 항산화능이 증가하였다. 이는 이전에 Kim 등(7)이 보고한 감마선을 조사한 경우의 항산화능 증가와 전자선을 조사한 이전의 연구 결과(8)와 유사한 값을 보인다. 방사선 조사에 의한 자숙액의 항산화능의 증가가 폴리페놀에 의한 영향이라면, 폴리페놀을 흡착시켜 제거한 자숙액 추출물에서는 방사선 조사에 의한 항산화능 증가가 나타나야 하지 않지만, 본 실험에서는 폴리페놀을 제거한 문어 자숙액 추출물의 방사선 조사에 따른 항산화능의 증가는 처리하지 않은 자숙액 추출물의 항산화능 증가와 유의적 차이가 없었다. 따라서 방사선 조사에 의한 문어 자숙액 에탄올 추출물의 항산화능의 증가는 폴리페놀 함량의 증가와 관련이 없다고 사료되었다. 또한 감마선과 전자선의 선종에 따른 항산화능 증가는 흡수선량 10, 50 kGy에서 차이가 없는 것이 확인되어졌다.

자숙액 단백질 추출물의 방사선 조사에 의한 항산화 활성 영향

자숙액 내에 다량으로 존재하는 단백질 성분의 방사선 조사에 의한 항산화능 변화를 확인하기 위하여 자숙액 추출물의 단백질 성분을 (NH₄)₂SO₄ 침전으로 분리하였다. (NH₄)₂SO₄ 침전은 다양한 단백질을 용해도에 의해서 분리하는 방법으로, 단백질은 구조상 소수성 부분은 분자 내부에 존재하고 친수성 부분이 분자 밖에 위치하여 물과 단단하게 결합되어

안정을 유지하는 구조인데 높은 세기의 이온은 친수성 부분에 있는 물 분자에 붙어 물 분자만을 잡아끌기 때문에 단백질이 침전되게 되는 것이다(22). 일반적으로 방사선 조사는 polypeptide chain의 공유 결합을 끊어 변화를 일으키는데 hydroxyl, superoxide 라디칼은 방사선 조사에 의해 단백질의 일차 구조에 영향을 주게 되고 결국 단백질의 이차 혹은 삼차 구조가 찌그러지게 되어 분해를 일으키거나 또는 가교 결합을 일으키게 된다(23). 문어 자숙액 내의 단백질을 (NH₄)₂SO₄로 침전시켜 단백질만을 추출한 후 증류수에 용해시켜 방사선 조사 전후의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다(Fig. 2). 문어 자숙액 단백질 추출물에 감마선을 조사하였을 때 비조사구에 비해 10 kGy 및 50 kGy 군에서 각각 45.06% 및 52.88%의 항산화능의 증가를 나타내었다. 또한 전자선을 조사하였을 경우에서도 비조사구에 비해 10 kGy 및 50 kGy에서 각각 42.90% 및 57.09%의 항산화능의 증가를 나타내었다. 이는 문어 자숙액 에탄올 추출물에 방사선 조사를 적용했을 때 항산화능이 비조사구에 비해 감마선 및 전자선 조사구에서 10.6% 및 8%의 증가를 보인 것보다 높은 수치였다. 이러한 결과는 자숙액 내의 단백질을 원래 농도 0.2 g/L보다 높은 1 g/L의 농도로 용해하는 과정에서 원래 자숙액 내의 단백질 양보다 5배 정도 많은 양의 단백질이 들어가게 되어 높은 수치의 항산화 활성 증가를 보이게 된 것이라고 생각된다. 즉, 농도가 5배 농축된 자숙액 단백질 추출물의 방사선 조사에 따른 단백질 수용액의 항산화능 증가는 자숙액의 증가의 5배 값을 보이고 있다. 또한 감마선과 전자선에 의한 자숙액 단백질의 항산화능 증가는 선량에 따른 차이를 보일 뿐 선종에 따라서는 차이가 없는 것으로 확인되어졌다.

Audette-Stuart 등(24)은 방사선 조사에 의하여 수용액 상의 단백질은 peptide 결합이 깨어지거나 중합된다고 보고하였다. Gaber(25)는 bovine serum albumin을 대상으로 감마선 조사에 의한 polypeptide chain의 분해, 가교, 응집 등을 관찰하였다. 따라서 방사선 조사에 의하여 자숙액 내의 단백

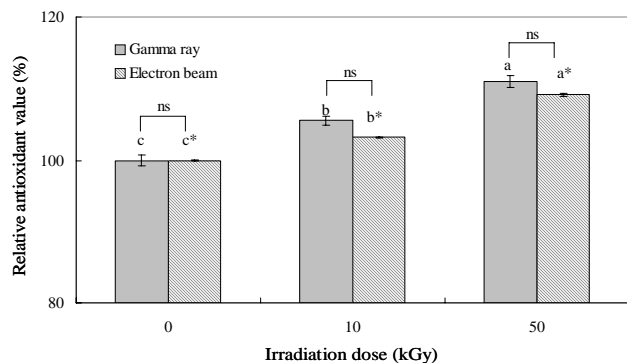


Fig. 1. Relative antioxidant activities of the cooking drip extracts without polyphenol of *Enteroctopus dofleini* after irradiation. ^{a-c}Different letters mean significant difference (p<0.05). ns means non significant difference.

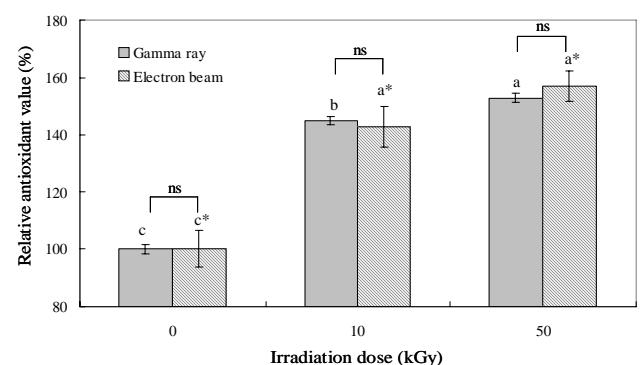


Fig. 2. Relative antioxidant activities of protein in cooking drip of *Enteroctopus dofleini* after irradiation. ^{a-c}Different letters mean significant difference (p<0.05). ns means non significant difference.

질 성분이 분해 또는 응집에 의하여 구조가 변화되어 항산화성이 증가된 것으로 사료된다. 이러한 방사선 조사에 의한 단백질의 분해 또는 응집 현상은 단백질의 주고, 농도, 선량에 크게 영향을 받기 때문에 자숙액 내의 항산화 단백질의 분리와 분리된 단백질의 방사선 조사에 의한 구조 변화는 향후 연구가 필요한 부분이다.

요 약

문어 자숙액 에탄올 추출물의 감마선 및 전자선 조사에 의한 항산화능의 증가 원인을 규명하고자 본 실험을 실시하였다. 문어 자숙액 에탄올 추출물에 polyclarTM를 처리하여 폴리페놀을 흡착시켜 제거한 자숙액 추출물의 방사선 조사에 따른 DPPH 라디칼 소거능 변화를 측정된 결과, 폴리페놀이 제거되지 않은 자숙액에서와 같은 방사선 조사에 의한 항산화능 증가가 확인되어졌다. 따라서 방사선 조사에 의한 자숙액의 항산화능의 증가는 폴리페놀에 의한 원인이 아닌 것으로 판단되었다. 자숙액에 많은 함량을 차지하고 있는 단백질에 대한 방사선 영향을 확인하기 위하여 (NH₄)₂SO₄를 이용한 침전법으로 분리하여 얻어진 문어 자숙액 단백질 수용액에 방사선 조사한 결과 감마선 및 전자선 조사에 의하여 50% 이상 라디칼 소거능이 증가하였다. 이러한 연구결과는 문어 자숙액에 감마선 및 전자선 조사를 적용하였을 때 항산화 활성이 증가하는 이유는 폴리페놀의 함량의 증가에 의한 것보다는 조사에 의해 단백질 구조가 변화되고 이에 따라 항산화 활성이 증가하게 되는 것이라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오 21사업의 해양바이오 프로세스연구단 연구비 지원(과제관리번호 M2007-05)에 의해 수행되었습니다.

문 헌

- Shahidi F, Naczki M. 2003. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton.
- Hiramatsu M. 1997. *Food and Free Radicals*. Springer-Verlag, New York.
- Cheong HS. 2007. Antioxidant effect of histidine containing low molecular weight peptide isolated from *Skipjack* boiled extract. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 221-226.
- Kim JS, Heu MS, Yeum DM. 2001. Component characteristics of canned oyster processing waste water as a food resource. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 299-306.
- Oh HS, Kang KT, Kim HS, Lee JH, Jee SJ, Ha JH, Kim JS, Heu MS. 2007. Food component characteristics of sea-food cooking drips. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 595-602.
- Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo YW, Park HY. 2005. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 435-439.
- Kim HJ, Choi JI, Lee HS, Kim JH, Byun MW, Chun BS, Ahn DH, Yook HS, Lee JW. 2007. Improvement of physiological activity of the ethanol extract from boiled-water of *Enteroctopus dofleini* by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1612-1616.
- Kim YJ, Kim HJ, Choi JI, Kim JH, Chun BS, Ahn DH, Kwon JH, Byun MW, Lee JW. 2008. Effect of electron beam irradiation on the physiological activities of cooking drips from *Enteroctopus dofleini*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1190-1195.
- WHO. 1999. High dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. *Technical Report Series* 890: 9-37.
- Huang SH, Mau JL. 2007. Antioxidant properties of methanolic extract from *Antrodia camphorata* with various doses of γ -irradiation. *Food Chem* 105: 1702-1710.
- Variyar PS, Limaye A, Sharma A. 2004. Radiation-induced enhancement of antioxidant contents of soybean (*Glycine max* Merrill). *J Agric Food Chem* 52: 3385-3388.
- Harrison K, Were LM. 2007. Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts. *Food Chem* 102: 932-937.
- Prez MB, Caldern NL, Croci CA. 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem* 104: 585-597.
- Jo C, Son JH, Lee JH, Byun MW. 2003. Irradiation application for color removal and purification of green tea leaves extract. *Radiat Phys Chem* 66: 179-184.
- Gorinstein S, Weisz M, Zemser M, Tilis K, Stiller A, Flam I, Yakov G. 1993. Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines. *J Ferment Bioeng* 75: 115-120.
- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. 1996. *Protein methods*. Wiley-Liss, New York. p 91-93.
- Blois MS. 1958. Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Nie N, Bent D, Hull C. 1970. *SPSS: Statistical Package for the Social Sciences*. McGraw-Hill, New York.
- Shahidi F, Wanasundara PK. 1992. Phenolic antioxidant. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67-103.
- Kwon HJ, Jung U, Park HR, Shin DH, Jo SK. 2007. Effects of gamma irradiation on color changes and antioxidative activities of *Caesalpinia sappan* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1055-1061.
- Kahlos K, Kangas L, Hiltunen R. 1987. Preliminary studies on the antitumour activity of polar fractions extracted from *Inonotus obliquus*. *Acta Pharmaceutica Fennica* 96: 167-174.
- Choi EH, Oh YK, Kim MS. 2007. Purification of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*: Effect of ammonium sulfate precipitation and heat-treatment. *Trans Korean Hydrogen New Ener Soc* 17: 371-378.
- Von Sonntag C. 1987. *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis, London.
- Audette-Stuart M, Houée-Levin C, Potier M. 2005. Radiation-induced protein fragmentation and inactivation in liquid and solid aqueous solutions. Role of OH and electrons. *Radiat Phys Chem* 72: 301-306.
- Gaber MH. 2005. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. *J Biosci Bioeng* 100: 203-206.