

패 추출물의 항산화능에 미치는 열과 pH의 영향

김미정 · 최정수¹ · 송유진 · 이소영 · 김꽃봉우리 · 이소정 · 김서진 · 윤소영 · 전유진² · 안동현*

부경대학교 식품공학과 및 식품연구소

¹경남정보대학 식품과학계열, ²제주대학교 해양생물공학과

Effects of Heat and pH Treatments on Antioxidant Properties of *Ishige okamurai* Extract

Mi-Jung Kim, Jung-Soo Choi¹, Eu-Jin Song, So-Young Lee, Koth-Bong-Woo-Ri Kim, So-Jeong Lee, Seo-Jin Kim, So-Young Yoon, You-Jin Jeon², and Dong-Hyun Ahn*

Faculty of Food Science and Technology, and Institute of Food Science, Pukyong National University

¹Subdivision of Food Science, Kyungnam College of Information and Technology

²Faculty of Applied Marine Biotechnology, Cheju National University

Abstract This study was carried out to determine the optimum extraction conditions for *Ishige okamurai* by comparing the yields, total phenolic compound content (TPC), and antioxidant properties of its 95%, 70%, 50% fermented ethyl alcohol and water extracts. Additionally, the effects of heat and pH treatments on the antioxidant properties of the extracts were evaluated by their TPC and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging capabilities. The yields of the extracts were greatest in the order of water > 50% > 70% > 95% fermented ethyl alcohol, and the TPC of the 70% (26.18%) and 50% fermented ethyl alcohol (27.56%) extracts were higher than those of the others. However, in terms of DPPH radical scavenging and ferrous-reducing power, the 70% fermented ethyl alcohol extract of *Ishige okamurai* showed the highest antioxidant effects. Additionally, in the results for the heat and pH treatments, the antioxidant properties of the 70% fermented ethyl alcohol extract were not influenced by the treatment conditions except at pH 10.

Key words: *Ishige okamurai*, fermented ethyl alcohol, antioxidant, heat, pH

서 론

지구 표면의 약 70%를 점유하고 있는 해양에는 광대한 자원과 어패류 및 해조류 등 다양한 종의 생물들이 서식하고 있다. 이 중 해조류는 카르복실기와 황산기가 결합된 양이온과 결합력이 높은 다당류를 많이 함유하고 있어 유해 중금속을 배출하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(1). 또한 장내 유해미생물의 증식을 억제하는 동시에 유익한 균의 증식을 촉진함으로써 정상 작용과 변비를 개선하는 효과(2,3)를 지닌다. 그 외에도 항산화효과(4,5) 및 당내성 증진효과(6,7) 등의 생리활성이 있다고 알려져 있다. 특히 갈조류에는 alginic acid, fucoidan 및 laminaran 등의 다당류가 함유되어 있어 혈중콜레스테롤 저하효과(8), 항암효과(9), 항혈액응고효과(10) 및 혈압강화작용(11) 있는 것으로 보고되었으며, 녹조류와 홍조류에 비해 높은 생리활성을 보이는 것으로 알려져 있다(12). 패는 이러한 갈조식물 중 디크티오시폰 목(Dictyosiphonales) 넓은미역과(Phaeophyta)에 속하는 것으로

색은 암갈색이며 건조하면 흑색을 띠고 우리나라 남해안과 일본 지역에 주로 서식(13) 한다. 현재까지의 패에 대한 연구로는 항응혈성(14), 인체 면역 결핍 바이러스인 HIV-1의 억제효과(13), 토코페롤 함량(15) 그리고 laminaran 구조 분석(16) 등이 연구 되었지만 항산화에 대한 연구는 아직 미비한 상태이다.

지질의 산화는 식품 품질저하의 주요한 원인일 뿐만 아니라 산화생성물은 발암성 물질로써 인체에 심각한 위해를 일으키는 것으로 보고되고 있다(17). 이에 천연항산화제 보다 그 항산화력이 우수한 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), tert-butylhydroquinone(TBHQ) 등의 합성항산화제가 상업적으로 많이 사용되고 있으나, 최근 합성항산화제가 독성을 가지고(18), 암을 유발하는 것으로 알려지면서(19) 안전성에 대한 문제가 대두됨에 따라 합성항산화제에 대한 소비자의 기피현상이 나타나고 있다. 이러한 문제로 tocopherol, flavone 유도체, sesamol, gossypol, 단백질의 가수 분해물 및 일부 향신료 등과 같은 천연항산화제의 개발이 진행(20)되고 있지만 단독으로는 산화반응 저지 능력이 낮으며(21) 실제 사용되고 있는 tocopherol의 경우 동물성 유지에만 효력이 있고(22), 가격이 비싼 단점이 있다.

또한 항산화능이 뛰어나다고 알려진 BHA, BHT, α -tocopherol 등을 비롯한 대부분의 항산화제들은 일반적으로 열 및 pH에 불안정하여 식품 제조 공정에서 수반되는 열처리 및 pH 변화에 의해 상당부분 항산화능이 손실된다(23,24). 따라서 적은 양으로도 높은 항산화 효과를 나타내며, 식품에 첨가 시 향이나 색에 영향을 주지 않고 가공조건에 안정적인 새로운 천연항산화제의 개발

*Corresponding author: Dong-Hyun Ahn, Faculty of Food Science and Technology, and Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
Tel: 82-51-629-5831
Fax: 82-51-629-5824
E-mail: dhahn@pknu.ac.kr
Received September 1, 2008; revised December 2, 2008;
accepted December 4, 2008

이 요구된다. 이에 본 연구에서는 70% 발효주정으로 추출한 패의 항산화능 및 열, pH에 대한 안정성을 확인함으로써 식품 산업에 천연 항산화제로써의 적용 가능성을 검토 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 패(*Ishige okamurai*)는 제주도 연안에서 채취한 것으로 깨끗이 세척한 후 세절하고 동결 건조하여 분쇄 한 뒤 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

추출

동결건조 된 패 분말에 10배의 95, 70 및 50% 발효주정과 물을 가한 후 Shaker(Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 실온에서 24시간 추출하였다. 추출물은 209×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액은 취하고 얻어진 잔사에는 다시 10배의 용매를 가하여 3회 반복하여 추출 하였다. 3회 추출로 얻어진 여액은 filter paper(Advantec 5A, Tokyo, Japan)로 여과한 뒤 37°C water bath에서 rotary evaporator(RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압하에 농축하였다. 추출물은 37°C에서 건조시킨 후 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 페놀화합물 함량

총 페놀화합물 함량은 Folin-Denis(25)법을 변형하여 측정하였다. 초순수 6.5 mL, 시료 0.5 mL 및 Folin-Ciocalteu's 용액 0.5 mL를 첨가하여 혼합한 뒤 3분간 정치시켰다. 정치 후 무수 탄산나트륨 포화용액 1 mL와 초순수 1.5 mL를 가해 전체를 10 mL로 정용하여 상온에 1시간 방치 시킨 뒤 UV/visible spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Rochester NY., USA)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀화합물 함량은 표준물질로 gallic acid를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

DPPH radical 소거능은 Blois(26)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 0.2 mM DPPH 용액 0.5 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 UV/visible spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조구는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 또한 시료 자체의 색에 의한 흡광도 변화를 보정해주기 위하여 공시험은 0.2 mM DPPH 대신 methanol을 넣어 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼소거능(%)

$$= \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도} - \text{공시험의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

금속봉쇄력

금속봉쇄력은 Shimada 등(27)의 방법을 따라 측정하였다. 초순수 0.74 mL와 시료 0.2 mL를 혼합한 뒤 2 mM iron(II) chloride 용액 0.02 mL와 5 mM ferrozine 용액 0.04 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 흡광도는 UV/visible spectrophotometer로 562 nm에서 측정하였고, 대조구는 시료 대신 증류수를 가하여 동일한 방법으로 측정하였다. 또한 시료 자체의 색에 의한 흡광도 변화를 보정해주기 위하여 공시험은 sample과 같은 농도로 측정하여 흡광도를 측정하였다.

금속봉쇄력(%)

$$= \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도} - \text{공시험의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

환원력

환원력은 Oyaizu(28)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL 및 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가해 충분히 혼합한 후 50°C의 water bath에서 20분간 반응시켰다. 반응정지를 위해 10% TCA 2.5 mL를 첨가한 뒤 209×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 된 상층액 2 mL에 초순수 2 mL와 0.1% iron(III) chloride 용액 0.4 mL를 첨가하였다. 초순수 4.4 mL를 가해 반응 용액을 1/2 희석한 후 UV/visible spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 나타내었다.

UV spectrum 측정

패 70% 발효주정 추출물의 최대흡수파장을 380-700 nm에서 UV/visible spectrophotometer로 scanning하여 얻은 후, 최대흡수파장에서 0.5 mg/mL 농도의 패 추출물 흡광도를 측정하였다.

열처리

열처리는 시료를 water bath를 이용하여 60°C에서 10분, 30분 및 60분간, 80°C에서 10분 및 20분간 처리하였고, autoclave를 이용하여 100°C에서 10분 및 20분간, 121°C에서 15분간 열처리한 후 급랭하였다. 이를 4°C에서 냉장보관 하면서 0.5 mg/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

pH 측정 및 처리

추출물의 pH 측정은 0.5 mg/mL 농도에서 pH meter(HM-30V, Toa, Japan)를 사용하여 측정하였다. pH 처리는 시료에 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl를 가하여 각각 pH 2, 4, 6, 8 및 10으로 보정한 후 24시간 동안 실온에 방치 시킨 뒤 본래의 pH로 중화하고 4°C에서 냉장보관 하면서 0.5 mg/mL로 희석시켜 실험에 사용하였다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 각각의 시료에 대한 평균 ± 표준편차로 나타내었다. SAS Program(Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분산분석을 실시하여 조사 항목들 간의 유의성 검정은 Duncan의 다중검정법으로 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

수율

발효주정은 전분질 및 당질 원료 등을 효모로 발효시켜 만든 것으로 인체에 무해하여 주류, 식음료류 및 추출 등의 용도로 사용된다. 본 실험에서는 패 추출물을 식품산업에 천연항산화제로써 적용이 가능한지 여부를 알아보기 위해 발효주정 및 물을 용매로 패 추출물을 제조하였다. 패 분말을 95, 70, 50% 발효 주정 및 물로 추출하여 그 수율을 알아본 결과(Table 1), 각각 9, 17, 18 및 20%의 수율을 보였다. 천연물에 함유되어 있는 성분 중 wax, 지질, terpenes 및 chlorophyll 등은 비극성 용매에 추출되고, 페놀 물질, 방향족 아민, 단백질 및 탄수화물 등은 극성 용매에

Table 1. Yields of *Ishige okamurai* extracted using various solvents
(Unit : %)

Yields	
95%	9.03±2.68 ^{a 1)}
70%	16.92±0.23 ^b
50%	18.41±0.67 ^b
Water	19.96±0.11 ^b

¹⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

추출되는 것으로 알려져 있는데(29), 본 실험에서 추출 용매의 극성이 높아질수록 추출 수율이 증가한 것으로 미루어 폐에 극성 물질이 다량 존재하는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 통해 70과 50% 발효주정 및 물 추출물이 95% 발효주정 추출물보다 높은 수율을 보였고, DPPH radical 소거능, 금속봉쇄력, 철 이온 환원력 등을 측정된 결과에서 높은 활성을 보여, 폐의 항산화제로서의 이용에 있어 높은 경제성이 있는 것으로 사료된다.

총 페놀화합물 함량

페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중의 하나로서 -OH기를 가져 수소를 공여하기 쉽고, 단백질 등의 거대분자들과 결합하는 성질이 있어 항산화, 항균 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(30). 95, 70, 50% 발효 주정 및 물로 추출한 폐의 총 페놀화합물 함량을 알아본 결과(Table 2), 각각 15.8, 26.2, 27.6 및 12.3 mg/g의 값을 보여, 70 및 50% 발효주정 추출물이 비교적 높은 함량을 보였다. 이와 같이 사용되는 용매에 따라 추출되는 페놀 화합물의 양이 다른 것은 용매의 극성에 따라 추출되는 물질이 매우 다르게 나타나기 때문이다. Santos 등(31)은 50-70% 에탄올로 지용성 및 수용성 페놀 물질을 고르게 추출 할 수 있고, 그 수율 또한 뛰어나 페놀 분석을 위해 70% 에탄올을 주로 사용한다고 보고하였다. 또한 본 실험 결과는 Zhao 등(32)의 연구에서 20-60% 에탄올로 추출한 건포도의 총 페놀화합물 함량이 가장 높은 결과를 보인 것과 유사하였다. 따라서 70% 및 50% 발효주정 추출물이 95% 발효주정 추출물과 물 추출물보다 높은 총 페놀함량을 보여 천연 식품 항산화제로써 더 적합 할 것으로 사료된다.

DPPH 라디칼 소거능

지질의 과산화 과정 중 만들어진 라디칼은 암, 동맥경화 등과 같은 질병을 유발하며, 인체의 노화를 촉진시킨다(33). 천연물에 있는 페놀 화합물 및 플라보노이드 등은 이러한 라디칼에 수소를 공여하여 라디칼을 환원시키거나 상쇄함으로써 지질 산화를 억제할 수 있다. 이에 폐 95, 70, 50% 발효 주정 및 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 0.015 mg/mL의 농도에서 알아보았다.

Table 2. Total phenolic compound content of *Ishige okamurai* extracted using various solvents
(unit : mg/g of dry sample)

Total phenolic compounds content	
95%	15.75±0.12 ^{a 1)}
70%	26.18±0.12 ^b
50%	27.56±0.22 ^c
Water	12.29±0.11 ^d

¹⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

그 결과(Table 3), 폐 발효 주정 추출물의 라디칼 소거능은 농도가 증가할수록 값이 증가하였으며, 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 90% 이상의 라디칼 소거능을 보였다. 이 결과는 1 mg/mL에서 95%의 라디칼 소거능을 보인 파베기 모자반 에탄올 추출물과 유사하였고(34), 40%의 값을 보였던 홍조 에탄올 추출물(35) 보다 높은 라디칼 소거능을 보였다. 하지만 물 추출물의 경우 0.5, 1 및 5 mg/mL 농도에서 농도가 증가할수록 값이 감소하여 각각 92, 91 및 84%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 이처럼 고농에서 오히려 낮은 라디칼 소거능을 보이는 것은 물 추출물 중에 고농도로 존재하게 되면 오히려 산화촉진제로 작용하는 성분이 존재하기 때문으로 추측된다(36). 낮은 농도인 0.1 mg/mL에서는 95, 70, 50% 발효 주정 및 물 추출물은 각각 55, 73, 70 및 56%, 0.05 mg/mL에서는 각각 34, 47, 42 및 37%의 라디칼 소거능을 보였다. 이 결과로 70% 발효주정 추출물이 가장 높은 라디칼 소거능을 나타내며, positive control로 사용한 BHT와 유사한 라디칼 소거효과를 보임을 확인하였다. 이와 같이 50과 70% 발효 주정 추출물의 DPPH radical 소거능이 높은 것은 폐에 함유되어 있는 항산화 물질이 이 조건에서 잘 용해되는 것으로 추정된다. 또한 식물체의 총 페놀함량이 높을수록 전자공여능이 높은 경향을 나타낸다는 Seog(37) 등의 보고와도 유사하였다.

금속봉쇄력

철은 인체의 대사과정 중 호흡, 산소의 운송 및 여러 효소의 활성에 꼭 필요한 성분이다. 그러나 Fe²⁺는 생체 내에서는 Fenton 반응(Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺ + OH⁻ + OH·)을 통해 hydroxy radical이나 superoxide radical 등의 생성을 촉진하여, 세포내 지질 및 단백질의 산화를 촉진하고, 식품의 가공 및 저장 중에는 지방질의 산화를 촉진 한다(38). 이에 폐 95, 70, 50% 발효 주정 및 물 추출물의 금속봉쇄력을 0.01-5 mg/mL의 농도에서 알아본 결과(Table 4), 5 mg/mL에서 각각 42, 39, 40 및 47%의 값을 보여, 물 추출물이 가장 높은 금속봉쇄력을 나타내었다. 그러나 모든 추출물은 0.05 mg/mL의 농도에서도 100%에 가까운 값을 보인 EDTA보다 낮은 금속 봉쇄력을 나타내었다. Lindsay 등(39)은 항산화 물질에 -OH, -SH, -COOH, -PO₃H₂, CO, -NR₂, -S- 및 -O-와 같은 구조

Table 3. DPPH radical scavenging effect of *Ishige okamurai* extracted using various solvents

(Unit : %)

mg/mL	95%	70%	50%	water	BHT
5	93.69±0.50 ^{C 1) a 2)}	96.50±0.26 ^{Aa}	94.80±0.48 ^{BC}	84.27±0.89 ^{Db}	95.43±0.24 ^{AB}
1	94.40±0.28 ^{Ba}	94.61±0.17 ^{Bb}	93.14±0.37 ^{Cb}	90.70±0.37 ^{Da}	95.60±0.34 ^{Aa}
0.5	94.46±0.17 ^{Ba}	94.41±0.44 ^{Bb}	93.18±0.12 ^{Cb}	91.83±0.10 ^{Da}	95.32±0.12 ^{Aa}
0.1	55.07±0.30 ^{Cb}	73.39±0.15 ^{Ac}	69.80±0.34 ^{Bc}	55.91±0.21 ^{Cc}	74.00±1.38 ^{Ab}
0.05	33.67±0.68 ^{Ec}	46.79±0.38 ^{Bd}	41.81±0.70 ^{Cd}	36.50±0.66 ^{Dd}	54.19±0.15 ^{Ac}
0.01	8.22±0.54 ^{Dd}	13.09±0.17 ^{Cc}	5.41±0.34 ^{Ec}	14.92±1.67 ^{Bc}	18.19±0.21 ^{Ad}

¹⁾Means in the same raw bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

²⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Chelating ability on ferrous metal ions of *Ishige okamurai* extracted using various solvents (Unit : %)

mg/mL	95%	70%	50%	water	EDTA
5	41.54±1.22 ^{C1) a2)}	39.21±0.37 ^{Da}	39.99±0.23 ^{Da}	47.19±0.33 ^{Ba}	100.00±0.10 ^{Aa}
1	8.08±0.74 ^{Eb}	10.23±0.23 ^{Db}	12.64±0.16 ^{Cb}	26.71±0.57 ^{Bb}	100.00±0.21 ^{Aa}
0.5	3.40±0.22 ^{Ec}	5.82±0.23 ^{Dc}	6.49±0.23 ^{Cc}	12.82±0.27 ^{Bc}	99.68±0.07 ^{Ab}
0.1	1.00±0.28 ^{Dd}	2.25±0.51 ^{Cd}	3.28±0.28 ^{Bd}	3.04±0.25 ^{Bd}	99.48±0.18 ^{Ab}
0.05	0.97±0.70 ^{Cd}	1.77±0.14 ^{Bd}	1.03±0.19 ^{Ce}	1.41±0.43 ^{Be}	97.05±0.30 ^{Ac}
0.01	1.00±0.28 ^{Bd}	0.87±0.58 ^{Be}	0.04±0.22 ^{Cf}	0.38±0.29 ^{ABf}	14.96±0.93 ^{Ad}

¹⁾Means in the same row bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

²⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Ferrous-reducing power of *Ishige okamurai* extracted using various solvents (Unit : %)

mg/mL	95%	70%	50%	water	Ascorbic acid
5	1.823±0.050 ^{B1) a2)}	1.894±0.019 ^{Ba}	1.833±0.020 ^{Ba}	0.769±0.029 ^{Ca}	2.264±0.014 ^{Aa}
1	0.437±0.024 ^{Cb}	0.489±0.004 ^{Bb}	0.460±0.014 ^{Cb}	0.243±0.005 ^{Db}	2.090±0.020 ^{Ab}
0.5	0.255±0.009 ^{Cc}	0.276±0.002 ^{Bc}	0.261±0.002 ^{Cc}	0.136±0.005 ^{Dc}	0.981±0.001 ^{Ac}
0.1	0.074±0.004 ^{Cd}	0.082±0.001 ^{Bd}	0.078±0.001 ^{Bd}	0.051±0.006 ^{Dd}	0.225±0.001 ^{Ad}
0.05	0.047±0.001 ^{Be}	0.053±0.001 ^{Be}	0.053±0.006 ^{Be}	0.040±0.008 ^{Cd}	0.089±0.001 ^{Ae}
0.01	0.029±0.001 ^{Be}	0.032±0.000 ^{Bf}	0.033±0.001 ^{Bf}	0.030±0.004 ^{Bd}	0.056±0.001 ^{Af}

¹⁾Means in the same row bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

²⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

를 한 가지 혹은 두 가지 이상 가진 것은 금속붕쇄력에 효과적이라 보고하였으며, Gordon(40)은 시그마 결합을 형성하는 구조가 금속이온의 산화된 형태에 안정성을 주어 산화-환원 반응을 감소시키기 때문에 금속 붕쇄제로서 효과적이라고 보고하였다. 본 실험에서 50과 70% 발효주정 추출물이 물 추출물보다 높은 총 페놀화합물 함량을 보였음에도 낮은 금속 붕쇄력을 보인 것은 페놀화합물 이외에 금속붕쇄력에 효과적인 다른 항산화 성분이 존재하거나 추출물 성분 내의 구조적인 영향이 금속붕쇄력에 영향을 주었기 때문으로 사료된다. Feng 등(41)의 보고에 따르면 항산화 물질의 작용은 연쇄 반응 개시의 방해, 전이금속물의 붕쇄, 과산화물의 분해와 라디칼 소거 등과 같은 기작으로 이루어지고 이러한 기작은 단독 또는 상호연관 되어 이루어지기 때문에 항산화 측정 방법에 따라 그 결과는 다르게 나타날 수 있다. 즉, 패 추출물의 항산화능은 금속 붕쇄를 통한 산화촉진방어 기작 보다 추출물 내의 페놀 물질과 환원성 물질이 라디칼 혹은 중간생성물질과 직접 반응함으로써 발휘하는 것으로 사료된다. 이는 노랑느타리버섯 (*Pleurotus citrinopileatus*) 균사체의 에탄올 추출물이 60% 이상의 항산화능을 가지나 금속 붕쇄력은 5% 미만으로 나타난 보고(42)와 유사 하였다.

Fe³⁺에 대한 환원력

환원성 물질은 라디칼에 수소를 제공하거나 산소원자를 공여함으로써 활성 산소를 파괴하여 항산화능을 발휘하는 것으로 생체 내에서는 과산화물 또는 과산화물 전구체와 직접적으로 반응하여 과산화물 형성을 막음으로써 항산화능을 가지는 것으로 알려져 있다(43). 패 95, 70, 50% 발효 주정 및 물 추출물의 Fe³⁺에 대한 환원력을 0.01-5 mg/mL의 농도에서 알아본 결과(Table 5), 모든 추출물의 Fe³⁺에 대한 환원력은 농도에 의존적으로 증가하였다. 5 mg/mL에서 95, 70, 50% 발효 주정 추출물은 각각 1.8, 1.9 및 1.8로 2.2의 값을 보인 ascorbic acid와 유사한 환원력을 보였으나, 물 추출물의 경우 0.8로 매우 낮은 환원력을 나타내었다. 1 mg/mL에서는 ascorbic acid가 2.1의 값을 보여 5 mg/mL 농도에서의 환원력보다 크게 감소하지 않았으나, 95-50% 발효주정 추

출물의 경우 환원력이 0.5로 급격히 감소하여, 낮은 농도에서는 ascorbic acid에 비해 효과가 떨어지는 것을 확인하였다. 본 결과에서 총 페놀화합물 함량이 비교적 높은 발효주정 추출물의 환원력은 높고, 총 페놀화합물 함량이 낮은 물 추출물은 환원력이 낮았다. 이를 통해 패에서 Fe³⁺에 대한 환원력을 보이는 물질이 페놀화합물일 가능성이 높은 것으로 사료되나, 현재까지 연구된 바에 의하면 페놀화합물이 항산화력을 나타내는 것은 radical과 쉽게 수소교환반응을 일으킬 수 있는 수소 원자가 존재하며 공명으로 안정화 될 수 있는 구조적인 특징과 관련성이 높다(44). 이러한 페놀화합물의 구조적 특징은 금속 킬레이트제, 환원제, 활성산소 소거제 및 사슬절단항산화제 등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다(45). 본 실험에서도 가장 높은 총 페놀화합물 함량을 보인 70과 50% 발효주정 추출물이 금속붕쇄력을 제외한 항산화능 측정에 있어서 가장 뛰어난 항산화능을 보였다. 특히, 패 70% 발효주정 추출물은 50% 발효주정 추출물보다 DPPH 라디칼 소거에서 높은 효과를 보여 70% 발효주정 추출물을 최적 추출물로 선정하고 70% 발효주정 추출물의 이화학적 특성과 열 및 pH 처리에 대한 항산화능의 안정성을 검토하였다.

색도

천연물에 함유되어 있는 chlorophyll과 flavonoid 같은 색소는 천연 항산화제로써 식품에 첨가 시 식품 자체의 색에 영향을 미쳐 관능적인 면에 있어 긍정적 혹은 부정적인 영향을 미치는 것으로 받아들여진다(46). 따라서 천연물을 식품에 첨가 할 때에는 추출물 자체의 색이 고려되어야 된다. 이에 UV-spectrum을 이용하여 패 70% 발효주정 추출물의 최대 흡수 파장을 가시광역에

Table 6. Physicochemical properties of *Ishige okamurai* extracted using 70% fermented ethyl alcohol

<i>Ishige okamurai</i>	
Optical density (427 nm)	0.414 ± 0.008
pH	5.90 ± 0.02

Table 7. Effects of heat treatment on antioxidant properties of *Ishige okamurai* extracted using 70% fermented ethyl alcohol

Temperature (°C)	Time (min)	Total phenolic compound content (mg/g of dry sample)	DPPH radical scavenging effect (%)
60	10	25.81±0.03 ^{bc1)}	94.40±0.10 ^{ab}
	30	25.48±0.03 ^{bcd}	94.43±0.28 ^{ab}
	60	25.31±0.03 ^{cd}	94.40±0.17 ^{ab}
80	10	25.98±0.03 ^{ab}	94.49±0.10 ^{ab}
	20	25.60±0.12 ^{bcd}	94.46±0.06 ^{ab}
100	10	25.93±0.00 ^{ab}	94.49±0.19 ^{ab}
	20	25.02±0.12 ^d	94.24±0.15 ^{bc}
121	15	24.21±0.08 ^c	94.03±0.12 ^c
control		26.48±0.19 ^a	94.65±0.24 ^a

¹⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

서 측정된 결과(Table 6), 초록색 빛을 반사하는 영역인 427 nm 에서 최대 흡수 파장을 보였다. 꽤 70% 발효주정 추출물의 흡광도를 최대흡수파장에서 0.5 mg/mL 농도로 알아본 결과, 0.414의 값을 보였다.

열 처리에 의한 총 페놀함량 및 항산화 효과 변화

식품의 제조과정 중에는 열처리가 수반되며, 그에 따라 천연 추출물의 항산화능이 영향을 받을 수 있으며, 열 이외에도 천연 추출물의 항산화능은 pH를 비롯한 여러 처리과정, 항산화물질의 농도, 저장 등의 요소들에 큰 영향을 받아 항산화 물질이 감소되거나 천연물 내 산화촉진 활성을 가진 물질의 반응이 야기되기도 한다(47). 항산화능이 뛰어나다고 알려진 BHA, BHT 및 α -tocopherol 또한 열 안정성이 떨어져 BHA의 경우 100°C에서 60분 이상의 처리와 150 및 200°C에서 10분 이상 처리 시 활성이 감소하며, BHT의 경우 100, 150 및 200°C에서 10분 이상 처리 시 활성이 감소하기 때문에 가공과정 중 고온처리가 필요한 제품에는 그 사용이 제한 될 수 있다(48,49). 따라서 항산화능이 뛰어나면서 열에 안정한 항산화 물질의 탐색이 요구되고 있다. 이에 본 연구에서는 꽤 70% 발효주정 추출물의 열 안정성을 총 페놀화합물 함량 및 DPPH 라디칼 소거능 측정을 통해 알아보았다. 시료에 열처리를 한 후, 총 페놀 화합물의 함량 변화를 알아 본 결과(Table 7), 무처리구와 60, 80, 및 100°C 처리구는 25-26 mg/g의 값을 보여 열처리에 의한 큰 변화 없이 비슷한 함량을 보였다. 121°C, 15분 처리구의 경우는 24 mg/g으로 나타나 26 mg/g의 함량을 보인 무처리구 보다 다소 낮은 값을 보였다. 이와 함께 열처리한 시료의 DPPH 라디칼 소거능(Table 4)을 측정된 결과, 모든 실험구에서 94%의 소거능을 보여 꽤 추출물의 항산화 효과가 열에 안정함을 알 수 있었다. 이 결과는 Sohn 등(50)이 100°C에서 10분간 열처리한 쌀 메탄올 추출물의 항산화능이 1/5배 이상 감소하였다는 결과와 비교 하였을 때 꽤 70% 에탄올 추출물의 열안정성이 매우 높은 것을 알 수 있었다. 그리고 오디 메탄올 추출물을 50°C에서 60분 처리 시 유의적인 차이가 없이 초기 활성을 유지한 결과(43)와는 유사한 경향을 보였다. 이와 같이 각각의 추출물 마다 열에 대한 항산화능의 안정성 정도가 다른 이유는 그 추출물속에 포함되어 있는 항산화 성분이 각각 다르며 이들의 열안정성이 다르기 때문으로 사료된다.

pH 처리에 의한 총 페놀함량 및 항산화 효과 변화

대부분의 가공식품 제조에 있어 pH는 품질 특성에 중요한 영향을 미친다. 특히 단백질에 있어서 pH는 단백질의 용해도 및 추출율에 영향을 미치며(51), 효소에 있어서 효소의 활성에 관련한다(52). 또한 저장성 및 색소 안정성에도 영향을 미쳐 안토시아

Table 8. Effects of pH treatment on antioxidant properties of *Ishige okamurai* extracted using 70% fermented ethyl alcohol

pH	Total phenolic compound content (mg/g of dry sample)	DPPH radical scavenging effect(%)
2	25.73±0.38 ^{a1)}	94.36±0.06 ^c
4	26.14±0.03 ^a	94.57±0.16 ^c
6	25.89±0.09	94.40±0.10 ^a
8	23.14±0.09 ^b	94.06±0.16 ^b
10	20.15±0.50 ^c	89.23±0.16 ^c
control	26.18±0.12 ^a	94.53±0.21 ^a

¹⁾Means in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

닌계 색소의 경우 산성에서 적색 또는 청적색을 띄지만 알칼리를 첨가하게 되면 청록색으로 변하는 성질을 가진다(53). 따라서 천연 항산화제를 가공식품에 적용할 때에는 천연물 자체의 pH가 고려되어야 한다. 이에 꽤 70% 발효주정 추출물의 pH를 0.5 mg/mL에서 pH meter로 측정된 결과(Table 8), 약산성에 가까운 5.90의 값을 보였다. 꽤 70% 발효주정 추출물의 항산화능의 pH에 대한 안정성은 총 페놀화합물 함량과 DPPH 라디칼 소거능 측정을 통해 알아보았다. 총 페놀화합물 함량(Table 5)에 있어서, 무처리구 및 pH 2-6 처리구는 26 mg/g의 값을 보였고, pH 8 및 10 처리구는 각각 23과 20 mg/g의 값을 보여 무처리구 보다 낮은 값을 보였다. DPPH 라디칼 소거능(Table 5)에 있어서도 무처리구 및 pH 2-8 처리구는 94%의 라디칼 소거능을 보였으나 pH 10 처리구는 89%로 다소 감소된 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 이를 통해 꽤 추출물의 항산화 효과가 산성과 중성 영역에서는 안정하나 알칼리 영역에서는 불안정한 것을 알 수 있었다. 이 결과는 감초 에탄올 추출물에 pH 3, 5, 7 및 9로 처리한 결과, DPPH 라디칼 소거 활성이 알칼리 영역에서 감소하였으며(54), 오디 메탄올 추출물은 pH 3, 5, 7, 9 및 11로 처리 시 pH 9와 11 처리구에서 지질산화가 촉진되었다고 보고한 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(43). 또한 Koo 등(55)의 연구에서 김 성분중의 하나인 porphyrin에 알칼리 처리 시 황산기의 함량이 감소하였다고 보고 하였다. 이와 같이 알칼리영역에서 항산화 활성의 감소는 해조류의 항산화능을 대표하는 물질인 황산기가 알칼리 처리에 의해 감소하였기 때문인 것으로 사료된다(55). 따라서 꽤 70% 발효주정 추출물을 식품산업에 적용 시 알칼리 처리는 가급적 피하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 꽤 추출물의 항산화능을 알아보고, 열 및 pH에

대한 안정성을 확인하여 식품 산업에서 천연항산화제로써의 적용가능성을 알아보았다. 이에 패를 95, 70, 50% 발효주정 및 물로 추출한 뒤 각 추출물의 항산화능을 측정하여 최적 추출 조건을 선정하였고, 최적 추출물의 이화학적 특성과 열 및 pH 처리에 따른 안정성을 알아보았다. 그 결과 70% 발효주정 추출물에서 17%의 비교적 높은 수율과 26 mg/g의 높은 총 페놀화합물 함량을 보이며, 0.1 mg/mL에서 약 73%의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보여 이를 최적 추출물로 선정하였다. 70% 발효주정 추출물을 60°C에서 10, 30 및 60분, 80°C와 100°C에서 10분, 20분 그리고 121°C에서 15분간 열처리하여 열안정성을 알아본 결과, 무처리구 및 모든 처리구에서 94%의 DPPH 라디칼 소거능과, 24 mg/g 이상의 총 페놀화합물 함량을 유지하여 높은 열안정성을 보였다. 패 70% 발효주정 추출물의 pH처리에 의한 항산화능의 안정성을 알아본 결과, pH 2, 4, 6 및 8 처리구의 경우 무처리구와 유사한 항산화능을 보여 높은 pH 안정성을 나타냈으나, pH 10 처리구의 경우 89%의 라디칼 소거능과 20 mg/g의 총 페놀화합물 함량을 보여 다소 감소된 항산화능을 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 패 70% 발효주정 추출물은 높은 수율과 항산화능을 가지며 열 및 pH에 대해 높은 안정성을 가져 식품 산업에 유용하게 사용 될 수 있을 것으로 사료 된다.

감사의 글

본 연구는 경남정보대학 교수 R & D활성화 사업에 의해 수행되었으며, 부분적으로 2008년도 Brain Busan 21사업에 의한 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Kim YY, Lee KW, Kim GB, Cho YJ. Studies on physiochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition. J. Korean Fish Soc. 33: 393-398 (2000)
2. Lee HA, Lee SS, Shin HK. Effects of dietary fiber source on the composition of interstitial microflora in rats. Korean J. Nutr. 27: 988-995 (1994)
3. Park EY, Lee SS. Effects of dietary fiber on the serum lipid level and bowel function in aged rats. Korean J. Nutr. 29: 934-942 (1996)
4. Haung HL, Wang BG. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qungdao coastline. J. Agr. Food Chem. 52: 4993-4997 (2004)
5. Yan X, Nagata T, Fan S. Antioxidative activities in some common seaweeds. Plant Food Hum. Nutr. 52: 253-262 (1998)
6. Kim EH, Vuksan V, Wong E. The relationship between viscosity of soluble dietary fiber and their hypoglycemic effects. Korean J. Nutr. 29: 615-621 (1996)
7. Cho YJ, Bang MA. Effects of dietary seaweeds on blood glucose, lipid and glutathione enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 987-994 (2004)
8. Jung BM, Ahn CB, Kang SJ, Park JH, Chung DH. Effects of *Hijikia fusiforme* extracts on lipid metabolism and liver antioxidative enzyme activities in triton-induced hyperlipidemic rats. J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr. 30: 1184-1189 (2001)
9. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. Antitumor effects and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 23: 345-352 (1990)
10. Yoon JA, Yu KW, Jun WJ, Cho HY, Son YS, Yang HC. Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweeds and optimization of extraction condition. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1098-1106 (2000)
11. Girard JP, Marion C, liutkus M, Boucard m, Rechencq E, Vidal JP, Rossi JC. Hypotensive constituents of marine algae. 1. Phar-

- macological studies of laminine. Planta Med. 54: 193-196 (1988)
12. Lee NH, O KL. Screening of radical scavenging effects from marine algae. Cheju J. Life Sci. 3: 95-101 (2000)
13. Ahn MJ, Yoon KD, Kim CY, Kim JH, Shin CG, Kim J. Inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase and integrase of a carmalol derivative from a brown Alga, *Ishige okamurae*. Phytother. Res. 20: 711-713 (2006)
14. Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, Jeon YJ. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. Bioresource Technol. 98: 1711-1716 (2007)
15. Nakamura T, Nagayama k, Kawaguchi S. High Tocopherol Content in a Brown Alga *Ishige okamurae*. Fisheries Sci. 60: 793-794 (1994)
16. Meade M, Nishizawa K. Laminaran of *Ishige okamurai*. Carbohydr. Res. 7: 97-99 (1968)
17. Lee YS, Joo EY, Kim NW. Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. Korean J. Food Pres. 12: 75-79 (2005)
18. Kan IH, Cha JH, Han JH, Lee SW, Kim HJ, Kwon SH, Ham IH, Hwano BS, Whang WK. Isolation of antioxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves. Korean J. Pharmacogn. 36: 121-128 (2005)
19. Dziejak JD. Antioxidants. Food technol. Chicago 40: 94 (1986)
20. Chung HY. Development of natural antioxidants stable at frying temperatures. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 10(4): 564-573 (1997)
21. Halliwell B, Hoult RJ, Blake DR. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. FASEB J. 2: 2867-2870 (1988)
22. Corl MM. Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action. JAOCS. 51: 321 (1974)
23. J.M. Cruz, E. Conde, H. Dominguez, J.C. Parajo. Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. Food Chem. 100: 1059-1064 (2007)
24. Park KB, Han GH, Kim BY. Utilization of the natural antioxidants for the anti-peroxidation of almond cracker. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 131-136 (2003)
25. Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I-The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agr. 10: 63-68 (1959)
26. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1990-2100 (1958)
27. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agr. Food Chem. 40: 945-948 (1992)
28. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 44: 307-315 (1986)
29. Cho SH, Kang SE, Cho JY, Kim AR, Park SM, Hong YK, Ahn DH. The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum silvicastrum*) extracts. J. Med. Food 10: 479-485 (2007)
30. Cuvelier ME, Richahard H, Berset C. Antioxidative activity of phenolic composition of pilot plant and commercial extracts of sage and rosemary. J. Am. Oil. Chem. Soc. 73: 645-652 (1998)
31. Santas J, Carbo R, Gordon MH, Almajano MP. Comparison of the antioxidant activity of two spanish onion varieties. Food Chem. 107: 1210-1216 (2008)
32. Zhao B, Hall CA. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. Food Chem. 108: 511-518 (2008)
33. Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. J. Agr. Food Chem. 51: 4563-4569 (2003)
34. Cho SH, Cho JY, Kang SE, Hong YK, Ahn DH. Antioxidant activity of mojabanchromanol, a novel chromene, isolated from brown alga *Sargassum silvicastrum*. J. Environ. Biol. 29: 479-484 (2008)
35. Suresh Kumar K, Ganesan K, Subba Rao PV. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty-an edible seaweed. Food Chem. 107: 289-295 (2008)
36. Kanner J, mendel H. Prooxidant and antioxidant effects of ascorbic acid and methal salts in a β -carotene-linoleate model system. J. Food Sci. 42: 60-64 (1977)
37. Seog HM, Seo MS, Kim SR, Park YK, Lee YT. Characteristics

- of barley polyphenol extract(BPE) separated from pearling by-products. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 775-779 (2002)
38. Decker EA, Hultin HO. Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. pp. 1-11. In: Lipid oxidation in food. St. Angelo AJ (ed.). ACS Symposium Series 500, Washington DC, USA (1992)
 39. Lindsay RC. Food additives pp. 778-780. In: Food chemistry Fennema OR (ed). Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA (1996)
 40. Gordon MH. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. pp. 1-18. In: Food antioxidants. Hudson BJB (ed). Elsevier Applied Science, London, UK (1990)
 41. Feng T, Du Y, Li J, Hu Y, Kennedy JF. Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. Carbohydr. Polym. 73: 126-132 (2008)
 42. Lee Y, Huang GW, Liang ZC, Mau JL. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. LWT-Food Sci. Technol. 40: 823-833 (2007)
 43. Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem. 102: 1233-1240 (2007)
 44. Kwak CS, Kim SA, Lee MS. The correlation of antioxidative effects of 5 korean common edible seaweeds and total polyphenol content. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 1143-1150 (2005)
 45. Kandaswami C, Middleton EJ. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids, pp 351-376. In: Free radicals in diagnostic medicine. Armstrong D (ed). Plenum Press, London, UK (1994)
 46. Son JH, Jo C, Kim MR, Kim JO, Byun MW. Effects of gamma irradiation on removal of undesirable color from green tea extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 1305-1308 (2001)
 47. Gazzani G, Papetti A, Massolini G, Daglia M. Antioxidative and pro-oxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effects of thermal treatment. Food Chem. 6: 4118-4122 (1998)
 48. Sanhueza J, Nieto S, Valenzuela A. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. JAOCS. 77: 933-936 (2000)
 49. Cruz JM, Conde E, Dominguez H, Parajo JC. Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. Food Chem. 100: 1059-1064 (2007)
 50. Sohn HY, Kwon CS, Son KH, Kwon GS, Kwon YS, Ryi HY, Kum EJ. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 593-598 (2005)
 51. Kown HJ, Lee KH, Kim JH, Chun SS, Cho WS. Effects of protease on the extraction and properties of the protein from silkworm pupa. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 49: 304-308 (2006)
 52. Lim SI. Purification and characterization of protease produces by *Aspergillus wentii* isolated from korean traditional *Meju*. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 161-167 (2000)
 53. Torskangerpoll K, Andersen OM. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. Food Chem. 89: 427-440 (2005)
 54. Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root(*Glycyrrhiza glabra*). Korean J. Food Sci. Technol. 38: 584-588 (2006)
 55. Koo JG, Park JH. Chemical and gelling properties of alkali-modified porphyran. J. Korean Fish. Soc. 32: 271-275 (1999)