

구멍갈파래의 면역활성 증진을 위한 추출방법 비교

한재건¹ · 하지혜¹ · 최영범³ · 고정림³ · 강도형⁴ · 이현용^{1,2*}

¹강원대학교 BT특성화학부대학, ²강원대학교 생명공학연구소, ³정우식품, ⁴한국해양연구원

The Comparison of Extraction Process for Enhancement of Immunomodulating Activities of *Ulva pertusa kjellman*

Jae Gun Han¹, Ji Hye Ha¹, Yeong Beom Choi³, Jeong Lim Go³, Do Hyung Kang⁴, and Hyeon Yong Lee^{1,2*}

¹College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University

²Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

³Jeong Woo Foods Co.

⁴Korea Ocean Research & Development Institute

Abstract The purpose of this study was to investigate the immunomodulatory effect of *Ulva pertusa kjellman* extract after undergoing a low temperature and high-pressure extraction process. First, the extracts obtained under the extraction conditions of 150 MPa and 80°C showed a relatively high antioxidant activity, with 90% super oxide radical activity compared to the extracts from conventional extraction process with water at 100°C. This extract also improved the growth of both human immune B and T cells up to 14.5×10^4 cells/mL and 14.2×10^4 cells/mL compared to 9.1×10^4 cells/mL in adding the extracts from conventional processes. It was found that the extracts obtained at 100 MPa and 60°C showed better activities in NK cell growth and NO production from macrophage as 11.8×10^2 cells/mL and 30.0 μM. Overall, the extracts from high pressure and low temperature extraction process had relatively higher immune activation activity, possibly because the low temperature and high pressure extraction process may have higher yields of active compounds and have less damage to useful ingredients from relatively weak marine natural resources, such as *Ulva pertusa kjellmann* than that from the conventional extraction system.

Key words: *Ulva pertusa kjellmann*, high-pressure extracts, immuno modulating activity

서 론

천연자원으로부터 신기능성 생리활성 물질들을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있으나 그 대상이 식물체에만 편중되어 추출기술 등이나 그 활용이 제한적인 것이 현실이다(1,2). 최근 해양에 대한 관심이 고조되면서 해양 생물자원에서도 새로운 생리활성 물질 탐색 연구가 활발하다(3). 구멍갈파래(*Ulva pertusa kjellman*)는 단독 또는 2-3가닥 뭉쳐서 나고 높이가 10-30 cm 또는 그 이상에 달하며 제주도 연안 하부에 큰 군락을 이루며 계속 자란다. 담수가 유입되는 지역에도 많이 생육하고 특히 겨울부터 늦봄까지 걸쳐 활발히 생육한다. 여름에는 쇠퇴하여 해안선에 주로 남게 되고 연중 생육한다.

다른 해조류와 마찬가지로 표면 전체를 통해 영양분을 흡수하여 수계에 비해 최대 수만 배까지 미네랄을 농축하고 있다(4). 또한 다량의 미량성분이 함유되어 대사작용 개선에 관여하며, 식이

섭유에 의한 정장작용에 효능이 입증되었다(4-6). 갈파래의 주요 특성의 하나는 육상 식물과 달리 황산기를 함유한 다당을 다량 함유하고 있으며 이 산성 다당은 항 종양성, 항 바이러스성, 면역증강 효과, 혈액의 항 응고 작용 등이 보고되었다(4,7,8). 또한 국내에서는 홰파래에서 추출한 당 단백질의 항암효과 및 면역활성이 연구 된 바가 있다(9).

반면, 구멍갈파래의 녹조현상으로 환경문제를 야기하고 있으며, 폐기를 위해 자본 및 인력이 소비되고 있는 실정이다. 또한 구멍갈파래를 비롯한 해조류의 복합 산성 다당은 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 세균효소에 의하지 않고서는 분해되기 어려워 이용이 제한적이다(10). 또한 기존의 전통적인 추출방법은 에너지 소비가 많으며, 열로 인한 유용성분의 파괴, 단백질의 변성, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출과 열에 대하여 불안정하여 구멍갈파래 추출의 효율을 떨어뜨린다(11). 이러한 단점을 보완하고 수율을 증진하기 위해 저온, 고압 추출공정을 이용해 실험하였다.

고압추출 공정기술은 시료가 받는 압력이 증가함에 따라 시료의 유용성분 추출이 단시간에 가능하며, 불순물이 없으며, 단백질이 변성되고, 세포벽 또는 단백질의 변성 및 파괴에 영향을 주어 세포 내의 용매의 출입이 용이해 유용성분의 추출효율을 증진시키는 것으로 알려져 있다(12,13). 또한 구멍갈파래를 비롯한 해조류는 육상식물과는 다르게 ligno-cellulosic 구조를 이루어져 있지 않기 때문에 초고압의 공정이 없이도 유용성분의 용출이 가

*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea
Tel: 82-33-250-6455
Fax: 82-33-256-4819
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Received January 30, 2009; revised June 16, 2009;
accepted June 29, 2009

능할 것으로 사료된다(14).

따라서 기존 육상작물에 활용되는 고압 추출 공정기술을 해조류인 구멍갈파래에 적용 하여, 유용성분의 용출을 증진 할 것으로 사료된다. 이를 위해 본 연구에서는 고압추출공정을 통한 구멍갈파래의 추출 수율 및 이를 통한 유용 생리활성으로 노화억제 면역 활성실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 구멍갈파래는 제주도 성산포해안 앞바다에서 2008년 2월 채취한 후 35°C에서 4일간 열풍 건조하여 사용하였다.

고압추출방법

고압 추출을 위해 구멍갈파래 100 g을 비닐 팩에 물과 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 밀봉과 동시에, 고압 추출기(FOOD CIP-70-350-80, Ilshin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 100 MPa 60°C, 150 MPa 80°C의 조건으로 15분간 고압 추출을 시행하였다(15).

대조군은 사용된 일반적인 열수추출 방법을 이용하여 100 g의 구멍갈파래를 수직 환류냉각기가 부착된 추출 플라스크에 각각 10배의 증류수를 첨가한 뒤, 100°C에서 12시간 2회 반복 추출하였다.

얻어진 각각의 추출물들은 감압여과장치로 여과하고 농축 및 동결건조 한 후 분말을 얻어 실험에 사용하였다.

시약

실험에 사용하기 위한 세포는 미국 ATCC로부터 분양하여, 면역세포 생육 증진 효과에 이용된 T cell(Jurkat(T lymphocytes: acute T cell leukemia), ATCC, Manassas, VA, USA), B cell(Raji(B lymphocytes: human burkitts lymphoma), ATCC), Natural Killer cell(NK-92MI cell, ATCC)을 사용하였다.

대식세포 생성능 실험은 macrophage cell(J774.1 cell(Mouse (BALB/c), ATCC)을 사용하였다.

실험에 사용된 정상세포, 면역세포는 RPMI 1640 배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myo-inositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum을 첨가시켜 배양하였다. 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium(α -MEM)은 Gibco(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)사로부터 구입하였고, HEPES buffer는 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 Gibco사의 fetal bovine serum(FBS)과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trysin-EDTA는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다.

면역세포 생육 증진 효과

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 예비 실험으로 인간 신장 정상세포(HEK 293) 독성을 측정하여 구멍갈파래 추출물의 세포독성을 측정 0.6 mg/mL 이상의 농도에서 세포독성이 증가하는 결과, 면역세포 독성으로 인한 세포 생육에 영향을 미치지 않는 최적 농도인 0.5 mg/mL로 실험을 수

행하였다. 면역기능 증강 효과는 6 well plate에 세포를 1.0×10⁴ cells/mL의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 6일 동안 배양하면서 매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다(16).

NK(Natural Killer) cell의 면역증진 효과

ATCC로부터 분양 받은 NK-92MI cell을 D-MEM 배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myo-inositol, 20 mM folic acid, 10-4M 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum(Myelocult)에 2×10⁷ cells/mL의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포를 T-25 flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식도를 관찰하면서 3-4번의 계대 배양 후 세포를 원심 분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 4-5×10⁴ cells/mL 로 900 μ L씩 분주하고 24시간 후 T세포의 상층액을 각 plate에 100 μ L씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 이용하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정하였다(17).

대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

Macrophage의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 24 well plate에 4-5×10⁴ cell/mL의 농도로 넣은 5% CO₂, 37°C에서 48시간 동안 배양하였으며 실험에 사용하였다. macrophage에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화 되는 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitric의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상층액 50 μ L를 취하여 동일 부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1%, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Thermo max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μ M에서부터 0.25 μ M까지 RPMI 1640 medium으로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO 생성능의 양성 대조구 물질로는 Lipopolysaccharide(LPS; Lipopolysaccharides from escherichia coli K-235, Sigma)를 사용하였다.

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화활성 검색

항산화활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; Sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용하였다(18). DPPH 약 2 mg을 EtOH 15 mL에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 그리고 1 mg/mL의 농도로 추출된 시료분말을 충분히 녹인 후에, DPPH 용액 450 μ L에 시료분말 용액 50 μ L를 섞은 후 실온에서 10분간 방치 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 sigma사의 ascorbic acid를 사용하였다.

Superoxide Radical 소거효과

Super oxide radical 실험은 NBT(nitroblue tetrazolium, Sigma, St. Louis, MO, USA)환원방법에 의해 측정하였다(19). 반응액은 3 mL의 16 Tris-HCL buffer(pH 8.0)에 78 mM NADH, 50 mM NBT, 10 mM PMS(phenazin methosulfate, Sigma)를 포함하였다. 생성된 superoxide radical과 NBT와의 발색반응 생성을 uv/vis spectrophotometer(Molecular devices Co.)를 사용하여 560 nm 파장에서 측정하였다. 1 mg/mL로 농도로 고압 추출물과 일반 열수 추출물을 첨가하여 이들의 superoxide radical 제거능을 조사하였

고 대조군으로 Ascorbic acid를 사용하였다.

HPLC를 이용한 추출조건 별 peak pattern 비교

조건별로 추출된 생체 면역활성 물질의 비교를 위하여 고성능 액체크로마토그래피(HPLC; High-Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 조건 별 구멍갈파래 추출물의 peak를 얻고, 공정 간의 상호 분석을 하였다. 분리 조건은 시료를 분석용 water에 0.2 μm syringe filter로 여과하고 각각 100 ppm의 농도로 조제하여 injection volume 20 μL 로 측정하였다. HPLC 기기는 BIO-TEK instrument(Italy)사 HPLC 500 series의 BIO-TEK 522 controller Pump와 BIO-TEK HPLC 535 UV Detector(254 nm)를 사용하였고, Column은 Alltech사의 Prevail C_{18} (5 μm , 4.6 \times 250 mm)을 사용하였다. 이동상은 물과 메탄올(50:50, v/v)의 혼합용액을 사용하였고, 유속은 0.50 mL/min로 흘려주었다.

Scanning Electron Microscope 관찰

조건별 추출된 구멍갈파래의 표면 조직 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 진공주사현미경(S-3500N, Hitachi science systems, St. Louis, MO, USA)을 촬영하여 구멍갈파래의 표면을 1000배율로 확대하여 관찰하였다(20).

통계

SPSS program(ver. 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 *t*-test로 검정하였으며 모든 data는 평균 \pm 표준편차(Mean \pm standard deviation)로 나타내었다.

결과 및 고찰

추출조건별 수율비교

구멍갈파래의 추출수율은 Table 1과 같다. 모든 조건 중 150 MPa 80°C에서 가장 높은 수율을 나타내었다. 추출 수율은 100°C 일반 열수 추출에 비해서 250% 정도 증가한 것으로 나타났으며 100 MPa, 60°C 조건에서 각 150% 추출수율이 증가한 것을 확인할 수가 있었다. 이는 고압 처리를 통하여 시료의 조직과 세포벽에 변형이 일어나고 세포 내에서 용매의 투입이 일반 열수 추출 공정 보다 높아져 용출되지 않았던 산성복합 다당류를 비롯하여, 새로운 성분이 용출된 것으로 사료되며, 이는 면역 조절능 향상에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 100°C 이하의 저온 추출 공정이지만 고압 추출공정을 병행하여, 일반 열수 추출보다 높은 추출 수율을 얻을 수 있었으며 이는 고압 공정의 영향에 의한 것으로 사료된다.

면역세포 생육 증진 효과

면역증진효과를 확인하기 위하여 인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 B 세포와 T 세포에 대하여 면역세포 생육 촉진 효

Table 1. Comparison of extraction yields from *Ulva pertusa kjellman* according to the different extraction conditions

Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Yields (% w/w)
-	100	4.98 \pm 0.22*
100	60	8.31 \pm 0.50**
150	80	12.28 \pm 0.43***

Each value is presented as the mean \pm SE of three independent experiment. *, **, ***, $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; **, 100 MPa and 60°C; ***, 150 MPa and 80°C)

과를 통한 세포 생육도 측정을 통해 면역증진 효과를 확인하였다. 전체적으로 6일째에 최고로 높은 생육도를 보였으며 Fig. 3에서 B cell의 경우 150 MPa, 80°C에서 14.5 \times 10⁴ cells/mL로 가장 높은 생육도를 보였으며 Fig. 4에서 T cell의 경우도 역시 150 MPa, 80°C에서 14.2 \times 10⁴ cells/mL로 가장 높은 생육도를 보여주었다. 이는 고압 공정을 통한 복분자의 면역세포 증진효과와 비교하였을 때의 경우 B cell과 T cell에서 13.5 \times 10⁴ cells/mL, 14.2 \times 10⁴ cells/mL의 결과를 보인 것과 비슷한 수치로 면역세포의 생육을 증진시키는 성분이 함유되어 있으며, 고압 공정시 유용물질의 용출량 증가와 신물질의 용출을 통한 면역세포의 증진을 가져온 것이라 생각된다(15).

NK cell의 면역증진 효과

NK cell의 활성 측정을 위해 T cell 추출물을 첨가한 후 그 배양액을 NK cell에 첨가하여 생육도의 변화를 측정하였다. Fig. 5에서 6일 동안의 NK cell의 활성을 측정한 결과 모든 처리조건에서 생육도가 증가하였다. 6일째에 100 MPa, 60°C에서 11.8 \times 10² cells/mL를 보여 가장 높은 활성을 나타내었다. 구멍갈파래의 모든 추출물에서 높은 NK cell 활성도가 높게 나타났다. 면역세포 증식세포에서는 150 MPa, 80°C에서 높은 활성을 보였지만 NK cell 활성에서는 100 MPa, 60°C에서 높은 활성을 나타내었다. 높은 수율을 보인 150 MPa, 80°C에서는 항산화 활성이 높은 추출물이 많이 용출 되었을 것으로 사료되며 100 MPa, 60°C에서는 면역 활성성분이 용출이 많은 것으로 보인다. 따라서 상기 추출

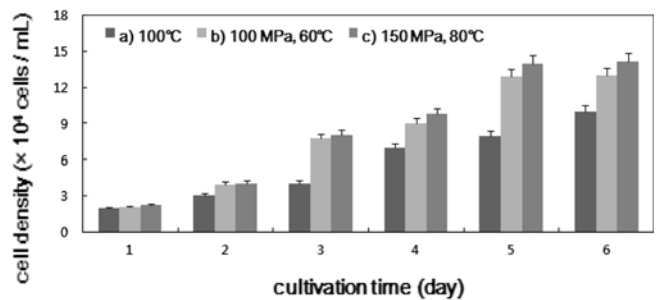


Fig. 1. The cell growth of B cells in adding 0.5 mg/mL of *Ulva pertusa kjellman* extracts. (a) 100°C water extracts (b) 100 MPa and 60°C (c) 150 MPa and 80°C. Each value is presented as the mean \pm SE of three independent experiments. *, **, ***, $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; **, 100 MPa and 60°C; ***, 150 MPa and 80°C).

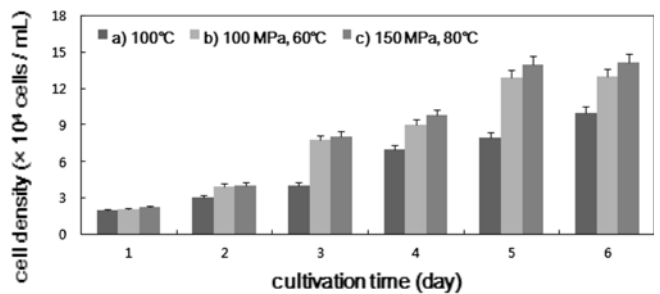


Fig. 2. The cell growth of T cells in adding 0.5 mg/mL of *Ulva pertusa kjellman* extracts. (a) 100°C water extracts (b) 100 MPa and 60°C (c) 150 MPa and 80°C. Each value is presented as the mean \pm SE of three independent experiments. *, **, ***, $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; **, 100 MPa and 60°C; ***, 150 MPa and 80°C).

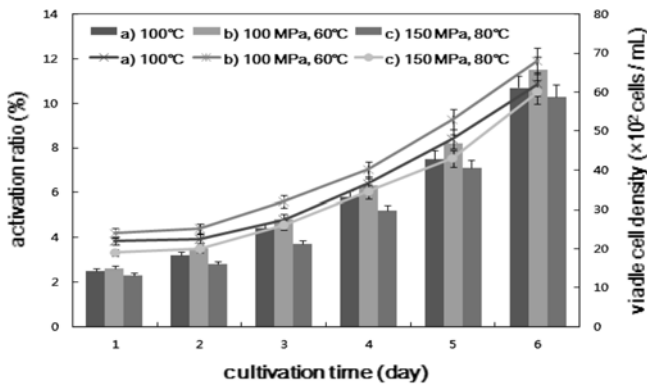


Fig. 3. The NK cell density of human B cell in adding the extract from *Ulva pertusa kjellman*. (a) 100°C water extracts (b) 100 MPa and 60°C (c) 150 MPa and 80°C. Each value is presented as the mean±SE of three independent experiments. * , ** , *** , $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; ** , 100 MPa and 60°C; *** , 150 MPa and 80°C).

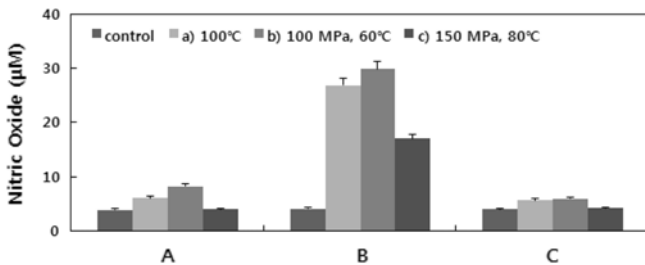


Fig. 4. Stimulation of nitric oxide production by adding the extracts from *Ulva pertusa kjellman*. (a) 100°C water extracts (b) 100 MPa and 60°C (c) 150 MPa and 80°C. Each value is presented as the mean±SE of three independent experiments. * , ** , *** , $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; ** , 100 MPa and 60°C; *** , 150 MPa and 80°C).

공정으로 미루어 보아 각기 조건에 따른 활성성분이 구분될 수 있다. 고압 공정의 최적의 압력과 온도를 연구한다면 여러 활성 효과 개발에 도움이 될 것으로 기대된다.

대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

대식세포를 이용하여 NO 생성능을 확인한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 대식세포의 NOS(nitric oxide syntase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS와 같은 세균 내 독소의 영향을 받아 NOS 유전자의 발현이 유도되기 때문에 이번 실험에서는 시료를 LPS와 같이 투여하여 NO의 생성능을 확인하였다.(B) 결과에서 보여 지듯이 LPS와 J774.1 세포주에 시료를 처리하여 배양한 후 배양액 중에 NO 농도를 측정된 결과 아무처리도 하지 않은 대조군(A, C)과 비교했을 때 각 시료의 NO 생산량에는 큰 변화를 관찰할 수 없었으나, 시료처리 후 높은 생성능을 확인하였다. 특히 10MPa, 60°C에서 가장 높은 30.0 μM 을 보여 주었다. 따라서 모든 추출물에서 높은 NO 생성능이 보여지고 있다. 또한 같은 갈파래류의 열수 추출물의 경우 NO 생성능이 27.0 μM 보여 구멍갈파래의 일반 열수 추출물과 같은 양상을 보인다(22). 이는 NO의 높은 생성능은 구멍갈파래에 면역생리 유용성분이 풍부하여 대식세포의 활성을 높인 것으로 생각된다.

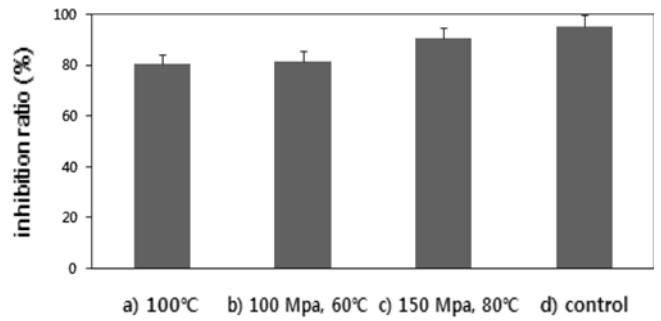


Fig. 5. The effect of extraction conditions on DPPH radical generation. (a) 100°C water extracts (b) 100 MPa and 60°C (c) 150 MPa and 80°C. Each value is presented as the mean±SE of three independent experiments. * , ** , *** , $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; ** , 100 MPa and 60°C; *** , 150 MPa and 80°C).

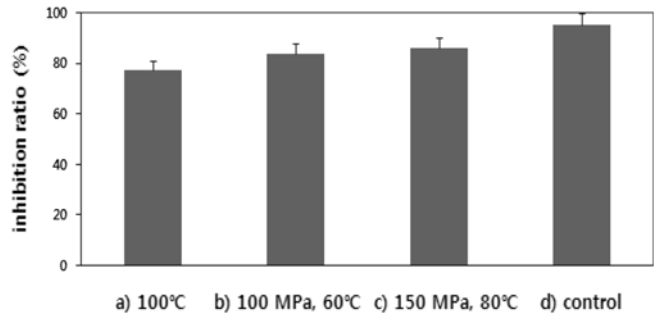


Fig. 6. Comparison of extraction conditions on superoxide radical generation. (a) 100°C water extracts (b) 100 MPa and 60°C (c) 150 MPa and 80°C. Each value is presented as the mean±SE of three independent experiments. * , ** , *** , $p < 0.05$: significantly different values (*, 100°C water extracts; ** , 100 MPa and 60°C; *** , 150 MPa and 80°C).

항산화활성 비교

항산화 물질의 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것이며 유리기 소거작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 인체 내, 항산화 효과를 나타내어 노화억제와 면역기능이 유지 될 있으므로 구멍갈파래 추출물의 항산화 활성에 대해서도 연구를 진행하였다(21). 구멍갈파래의 고압 추출물의 항산화 활성에 대한 결과는 Fig. 1 과 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 1은 DPPH radical 소거능을 통해 항산화 활성을 여부를 확인 하였다. 전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유 라디칼로서 대조군인 아스코르빈산 및 방향족 아민류, tocopherol, polyhydroxy 방향족화합물에 의해 전자나 수소를 받아 안정한 분자로 환원되어, 진보라색의 DPPH 색깔이 점점 열어져 흡광도가 감소하게 되므로 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 측정할 수 있다.

모든 샘플에서 대조군의 활성도인 95%와 비슷한 항산화 활성을 보이며 150 MPa, 80°C에서 91.4%의 가장 높은 활성을 보인다. 또한 ethyl-ether와 ethyl-acetate 추출물과도 91%의 유사한 수치를 나타낸다. 하지만 고압 공정의 장점인 공정의 단순화와 용매가 순수한 물이라는 점에서 생체 안정성 면에서 우수할 것으로 사료된다(22).

Fig. 2는 생체내의 항산화 방어기수 중 효소적 방어계의 하나로서 superoxide radical을 환원시켜서 산소 내 독성물질로부터 생

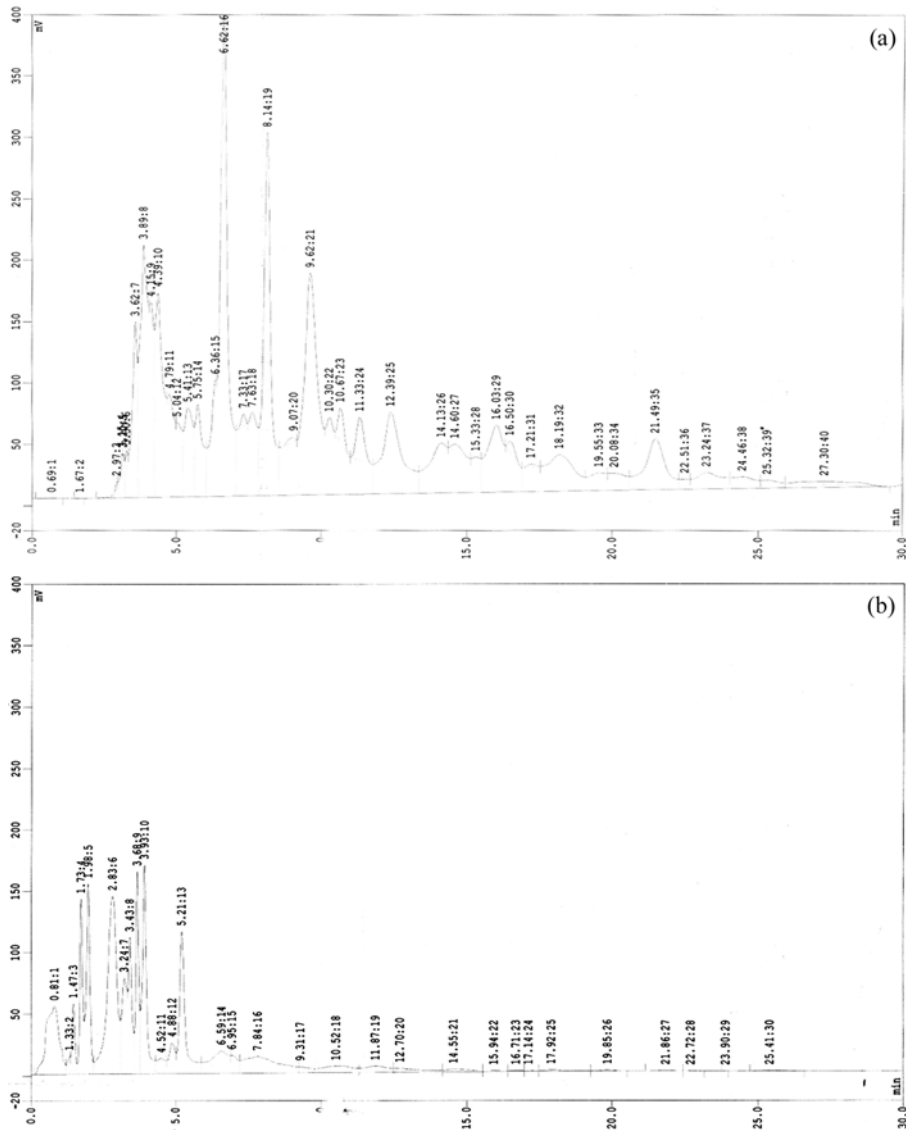


Fig. 7. Comparison of HPLC peaks of *Ulva pertusa kjellman*. (a) high pressure extraction (100 MPa and 60°C) (b) conventional extraction at 100°C.

체를 보호하는 superoxide radical 소거활성 여부로 확인하였으며 150 MPa, 80°C 조건의 추출물에서 90%의 활성도를 보이며 대조군의 활성도인 95%와 유사한 활성을 보인다. 위의 결과로 보아 구멍갈파래 추출물은 모든 결과에서 높은 항산화 활성을 가지며 이는 산화적 스트레스 감소로 인한 항암 및 면역 작용에 효과가 있을 것으로 보인다(19).

추출물의 HPLC pattern 비교

HPLC를 이용한 구멍갈파래의 분석 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 결과를 통해 peak가 유용 활성성분의 용출을 나타낸 것으로 보인다. (a) 일반열수 추출물은 초기 5분대에 peak가 나타나며 (b) 고압추출물의 경우, 5분대 전후로 하여 30분대까지 높고 많은 종류의 peak가 검출되었다. 이는 고압공정을 통한 단백질의 변성 및 세포벽의 변성 및 파괴에 따른 유용성분의 변형 또는 새로운 유용성분의 검출에 의한 것으로 사료되며 면역 활성 실험에 있어서도 일반추출물에 비해 높은 활성을 나타낸 것으로 보인다 (12,13). 따라서 추출공정에 따른 구멍갈파래의 유용활성 성분은

온도만 높이는 일반 추출공정 보다는 고압 공정을 통해 유용활성 성분 및 수율을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Scanning Electron Microscope 관찰

Fig. 8에서(A)는 100°C 물에서 일반 추출 한 것으로 구멍갈파래의 조직 표면이 비교적 대부분이 파괴되지 않고 정상 상태의 형태를 유지하고 있다. 반면 150 MPa, 80°C로 처리한(B)의 구멍갈파래 조직 표면이 다 변성 또는 파괴된 것을 확인할 수 있으며 위 결과로 말미암아 고압 기술을 이용하여 효과적으로 파괴된 구멍갈파래를 추출물의 면역활성과 항산화활성의 활성증진 정도를 가늠할 수 있으며 일반추출의 단점인 유용성분의 손실과 낮은 수율의 단점을 개선할 수 있을 것으로 보인다. 이는 추출조건 별로 용출되는 유용성분 및 용출량에 차이를 보이나 SEM 분석을 통하여 고압 공정을 통한 구멍갈파래의 생리활성 연구에서 일반 열수 추출보다는 용이하게 단단한 세포벽을 변성 또는 파괴할 수 있으며 유용성분을 용출한다고 볼 수 있다. 이는 저온에서도 충분히 고압만으로 유용성분을 용출할 수 있다고 판단된다.

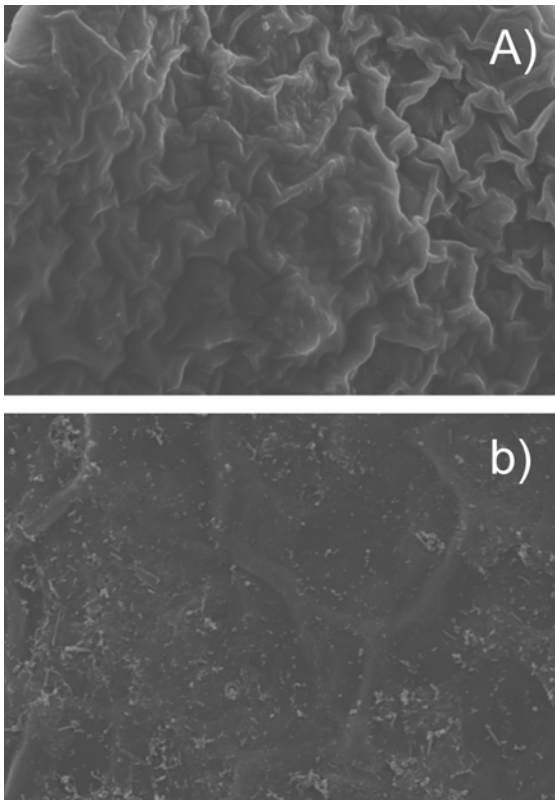


Fig. 8. Observation of SEM (Scanning Electron Microscope) of *Ulva pertusa kjellman* after extractions. (a) water extraction at 100°C (b) high pressure extraction at 100 MPa and 60°C.

요 약

본 연구는 제주도의 녹조현상의 원인인 구멍갈라래의 활용을 위해 고압추출 공정을 통한 추출물의 면역활성 확인 하였다. 150 MPa, 80°C 조건에서 Superoxide Radical 소거효과에서는 90% 로 활성도가 제일 높았으며, 면역세포 생육도면에서도 B&T cell, 각각 14.2×10^4 cells/mL 14.5×10^4 cells/mL 나타나 제일 높았다. 반면, NK cell과 NO 면역능 실험에서는 100 MPa, 30°C 조건에서 각각 11.8×10^2 cells/mL, $30.0 \mu\text{M}$ 을 보여 주었다. 결과를 통해 구멍갈라래는 면역활성을 가지며 고압 공정을 통한 추출물의 활성이 일반추출에 비해 높은 것을 알 수 있다. 따라서 해조류 및 다른 유용 자원에서도 고압 공정이 기존의 추출방법보다 높은 활성을 나타낼 것으로 판단되며 기능성 식품이나 기능성 소재로서 사용가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 중소기업 기술혁신 개발 사업(제2008-22호)의 지원에 수행됨에 따라 심심한 사의를 표합니다.

문 헌

1. Choe M. Dietary fats and cancer. J. Korean. Soc. Food Nutr. 5:

- 513-518 (1991)
2. Michael CA, Dominic AS, Anue M. Feasibility of drug screening with panel of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: 589-595 (1998)
 3. Ito K, Hori K. Seaweeds; chemical composition and potential food uses. *Food Rev. Int.* 5: 101-144 (1989)
 4. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetable, fruit, and cancer II mechanism. *Cancer Causes Aontril.* 2: 427-442 (1991)
 5. Ray B, Lahye M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvaes, chlorophyta), extraction and chemical composition. *Carbohydr. Res.* 274: 251-261 (1995)
 6. Ayako Y, Koichi Y, Keiichi O. Iodine distribution in blades of several laminarias grown in the same sea area. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 58: 1373-1379 (1999)
 7. Yoo JS, Cheun BS, Kim NG. Determination of Na^+ channel blocker in seaweeds. *Korean. J. Environ. Biol.* 19: 107-112 (2001)
 8. Azuine MA, Goswami UC, Katal JJ. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of carotenoids and dietary palm oil. *Nutr. Cancer* 17: 287-295 (1992)
 9. Newmark HL. Plant phenolics as potential cancer prevention agents, Adv. Extract obtained from seaweeds. *Bull. Korean. Fish. Soc.* 19: 502-508 (1996)
 10. Sugano Y, Kodama H, Terada I, Yamajaki Y, Noma M. Purification and characterization of a novel enzyme, α -neoagararooligosaccharide hydrolase, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Bacteriol.* 176: 6812-6818 (1994)
 11. Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK, Lee HY. Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Plant Res.* 16: 109-117 (2004)
 12. Zhang S, Zhu J, Wang C. Novel high pressure extraction technology. *Int. J. Pharm.* 278: 471-474 (2004)
 13. Koo SY, Cha KH, Lee DU. Effects of high hydrostatic pressure of foods and biological system. *Food Science and Industry* 40: 23-30 (2007)
 14. Kloareg B, Quatrano RS. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysical function of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol.* 26: 259-315 (1988)
 15. Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC, Lee HY. Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *rubus coreanus* miquel by ultra high pressure extract process. *Korean J. Medical Crop Sci.* 6: 398-404 (2007)
 16. Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Korean J. Medical Crop Sci.* 10: 109-115 (2002)
 17. Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G, Zhigang T. Expression of leptin receptors and reponse to leptin stimulation of human killer cell lines. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 300: 247-252 (2003)
 18. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1198-1200 (1958)
 19. Nishikimi M, Roa NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 46: 849-854 (1972)
 20. Kim CH, Kwon MC, Qadir SA, Hwang B, Nam JH, Lee HY. Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola schalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6: 411-416 (2007)
 21. Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU, Park MH, Han BH. Effect of ginsenosides from panax gineng on $\text{Tnf-}\alpha$ production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji* 42: 296-301 (1998)
 22. Kim IH, Hyun JW, Lee SH, Ha JM, Ha BJ, Lee JH. Immunological stimulating effects of the marine macroalgae, *Ulva lactuca* with different solvents. *Environ. Mutagen Carcinog.* 3: 89-92 (2006)