

해조류로부터 항고혈압성분의 분리정제

이승주·하왕현·최혜진·조순영*·최종원¹
 강릉원주대학교 식품가공유통학과, ¹경성대학교 약학대학

Separation and Purification of Antihypertensive Substances from Edible Seaweeds

Seung-Joo Lee, Wang-Hyun Ha, Hye-Jin Choi,
 Soon-Yeong Cho* and Jong-Won Choi¹

Department of Food Processing and Distribution, Gangneung-Wonju
 National University, Kangnung 210-702, Korea

¹College of Pharmacy, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea

To isolate natural antihypertensive substances from edible seaweeds, we screened for and separated active compounds contained in natural *Underia pinnatifida*, cultured *Underia pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Sporophylls* and *Agarum cribrosum*. They were extracted using room temperature water, boiling water, acetone, and methanol in turn or using room temperature water, ether, acetone, methanol and boiling water in order. The *in vitro* antihypertensive activity was quantified as inhibitory efficacy against angiotensin-I converting enzyme (ACE), which is a factor inducing hypertension. For all of the seaweeds tested, the fractions soluble in room temperature water and in boiling water showed the strongest ACE inhibitory effect among the extracted fractions. Conversely, the methanol-extracted fractions for all of the seaweeds tested showed no antihypertensive activity. While the ether and acetone fractions had slight antihypertensive effects. The compounds in the aqueous extracts that had antihypertensive activity were presumed to be polysaccharides, such as fucoidan and alginate.

Key words: Edible seaweeds, Antihypertensive, ACE inhibitory

서 론

우리나라는 예부터 해조를 식용, 호료(糊料), 약용, 사료, 비료, 해조 공업의 원료 등으로 이용하여 왔다. 또 최근에는 해조류에서 특정 성분을 추출하여 이용하는 이른바 건강 식품, 생리활성물질 원료로서도 각광을 받고 있다. 가장 흔한 미역과 다시마를 보면, 미역의 탄수화물은 mannit나 알긴산 등이고, 단백질은 12~13% 정도 들어 있으며, 요오드는 다시마가 0.34%인데 반해 0.03%에 불과하다. 다시마와 미역은 성분의 약 절반이 탄수화물이고 그 중 20%가 섬유질이며 나머지가 알긴산과 fucoidan이다. Blanching 처리후 미역 중에 mannitol과 가용성 무기질이 감소했는데, chlorophyll과 carotenoid는 유지되었다고 한다 (Byun et al., 1977). 최근들어 식품 성분의 생체 기능 조절을 해명하기 위한 생리 활성 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 이중 해조 성분 중의 생리 활성 작용에 대한 연구를 보면 Sakagami (1983)는 참김에서 추출된 porphyrin은 shay계양을 rat (체중 200 g)에 대한 실험에서 5 mg의 투여로서 완전히 저지하였으며, 꼬시레기에서 추출된 vercosin은 shay계양에 대해서는 12.5%의 저지율을 나타내고, stress 계양에 대해서 37.5%의 저지율을 나타내었다고 보고한 바 있다. Son et al. (1992)은 실험 동물인 Sprague-Dawley종의 흰쥐를 대상으로 혈압 변화를 측정할 결

과, 굴 껍질의 주요 bioflavonoid 성분인 hesperidin은 약물 투여 후 유의성있게 ($P<0.001$) 혈압 저하 효과가 있음을 관찰하였다고 보고하였다. Shigenobu et al. (1967)은 *Porphyra tenera*를 먹인 쥐의 혈장 콜레스테롤이 현저히 낮아지는 효과에 대한 대사를 알아보기 위하여 purple laver를 먹인 쥐와 먹이지 않은 쥐의 배설물에서 콜레스테롤의 양을 비교해 본 결과 purple laver를 먹인 쥐의 배설물에서 많은 콜레스테롤의 증가를 확인했다. 고혈압은 1차성 고혈압과 2차성 고혈압으로 분류가 된다. 다시 1차성 고혈압은 그 증상의 정도에 따라 경증, 중등도, 중증으로 나뉘어 질 수 있는데, 경증인 경우, 식염 섭취를 감소시키고, 체중 조절, 스트레스, 운동부족을 해소함으로써 치료 가능하지만 중등도 이상의 증세인 경우, 식이오법과 동시에 혈압 강하제를 투여하여야 한다. 한편 오랫동안 유전적 요인이 큰 1차성 고혈압의 경우에 단백질을 제한하는 것으로 알고 있었다. 그러나, 질소평형을 유지시키기 위해서 신장의 기능이 정상으로 단백질의 분해물인 질소를 배설할 수 있는 한 양질의 단백질을 충분히 공급하여야 한다. 이에 혈압 강하제로 이용하는데 있어 식품 단백질로부터 angiotensin converting enzyme (kinase II, peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1, 이하 ACE라 약함) 저해 peptide를 분리하는 것이 깊은 연관성이 있는 것으로 사료된다. 혈압 상승 요인의 하나인 angiotensin-1 전환 효소(ACE)는 혈압 강하작용을 가지는 bradykinin을 분해하여 불활성화 시키고 불활성 상태의

*Corresponding author: csygang@gwnu.ac.kr

angiotensin-1 C 말단 dipeptide(His - leu)를 절단하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 angiotensin -II로 활성화시켜 고혈압의 원인이 되게 하는데, gelatin의 가수분해물로부터 그 식품 단백질 유래의 angiotensin converting enzyme (ACE)저해 peptide가 발견되었다 (Oshima et al., 1979). 한편, Do et al. (1993)은 전통 기호 음료 원료에서 추출한 수용성 획분의 ACE 저해 작용은 생강 > 오갈피 > 오미자 > 들깨 > 결명자 > 모과 > 대추 순으로 나타났다고 보고하였으며, 그 외 여러 식품에서 ACE저해 peptide를 찾으려는 연구가 많았다 (Maruyama et al., 1989). 지금까지 ACE 저해 peptide에 대한 연구는 주로 식품에서 직접 용매 추출하고, column chromatography로 정제하는 것, pepsin, trypsin 등의 단백질 분해 효소로 분해한 후 정제하여 특성을 파악하는 것, 활성 peptide의 합성에 관한 것 등이 일부 수행되어 왔고 (Ariyoshi, 1993), 또한, preparative HPLC (prep-HPCL)를 이용하여 미생물이 분비하는 단백질분해 효소에 의하여 ACE 저해 효과를 파악하는 연구도 있었다. Kim et al. (1994)과 Lee et al. (1993)은 다시마의 효과적 추출을 위한 종합적인 추출 방법의 개발에 관해 다시마를 다당류 분해효소인 viscozyme, celluclast, ultrazyme을 사용하여 분해할 경우 viscozyme과 celluclast를 1:1로 혼합한 후 분해하는 것이 고형분 및 단백질 수율 그리고 상등액을 면에서 가장 적절하다고 보고하였다. 또한 이들은 다시마 열수 추출 (60~100°C)시 온도가 증가할수록 가용성

고형분과 단백질 수율이 높았고, 추출 1시간 이후부터는 완만한 증가를 보였다고 보고하였다. Koo et al. (1995)은 한국산 다시마 및 미역으로부터 fucoidan의 추출 및 정제에서 추출 수율이 다시마 2.71%, 미역 포자엽 6.65%, 미역 엽상체 0.40%로 나타나 부위에 따른 차이가 크다고 보고하였다. 본 연구에서도 항 고혈압성 물질의 추출대상으로 미역 포자엽과 미역 엽상체 각각을 재료로 이용하였다. 또, Kim (1974)은 비식용 해조인 구멍갈파래와 개말로부터 각각 19%와 17%의 단백질을 추출하였는데, 조단백질의 추출 조건은 tris buffer보다 물로 추출한 것이 우수하였고, 단백질의 분리 회수도 비등점에서 하는 것이 가장 수율이 좋았다고 보고하였다. 미역, 다시마등 오랫동안 일상적으로 식용해오면서 전혀 독성이 문제되지 않은 식용해조들을 대상으로 하여 분리 동정을 시도해봄으로써 성인병의 하나인 고혈압의 예방과 해조중의 약용 물질 추출이라는 해조의 색다른 고부가가치적 이용을 모색하고자 한다.

본 연구에서는 일상의 해조 시식법인 열수 추출액을 기본적으로 만들고, 그 외 일반적인 용매 및 상온수 추출을 일상 자주 대하는 해조들에 대해 행한 뒤 항고혈압성이 높은 해조와 그추출 획분을 검색하였다. 아울러, 1차적으로 조사된 해조와 추출 획분에 대해 한외 여과등의 수단을 응용하여 대량분리 정제를 시도하여 ACE 저해 효과가 있는 보다 큰 성분의 획분을 얻어 내하고자 하였다.

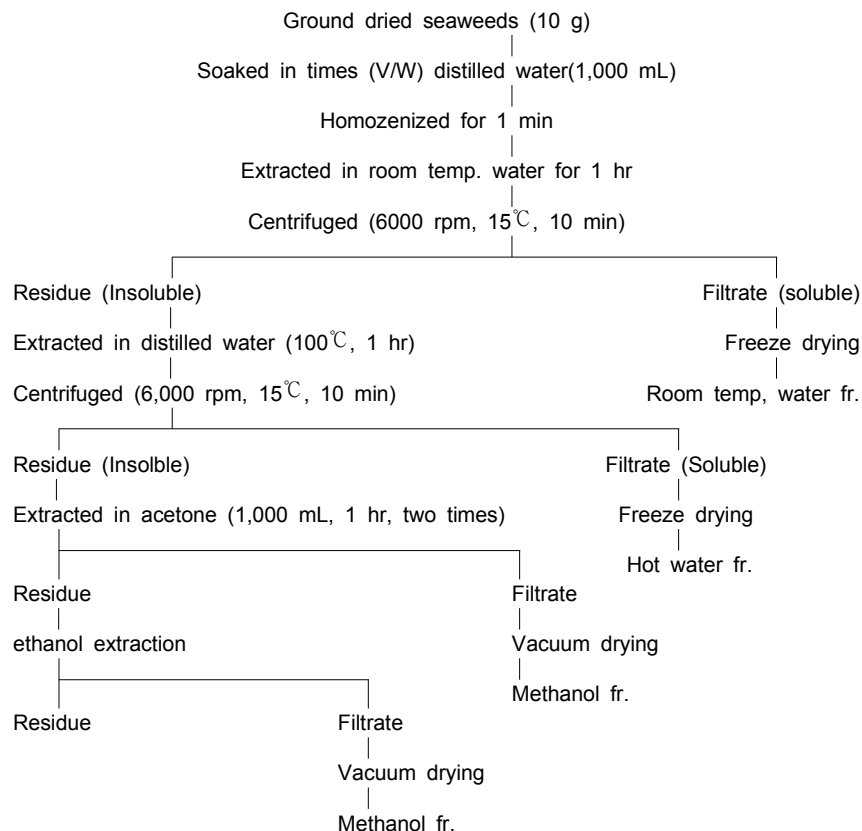


Fig. 1. First procedure for the extraction of bioactive compounds from the dried seaweeds.

재료 및 방법

재료 및 검색용 시료의 조제

실험 재료로는 이미 건조된 자연산 미역 엽상체 (줄기포함, *Natural Undaria pinnatifida*), 양식산 미역 엽상체 (*Cultural Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria japonica*), 미역 포자엽 (일명 미역귀 : Sporophyll of *Undaria pinnatifida*), 구멍쇠미역 (*Agarum cribrosum*) 등의 일반 식용 해조류를 사용하였다. 자연산 미역은 강원도 정동에서 2008년 6월에 채취한 것을, 양식산 미역은 경상북도 울진에서 2008년 3월에 채취한 것을, 다시마와 미역귀는 강원도 주문진에서 2008년 3월에, 자연산 쇠미역은 강원도 고성에서 2008년 6월에 채취한 것을 구입하였다. 재료는 1 cm 크기로 분쇄하여 저온실에 보관하면서 사용하였다.

시약

항고혈압성 측정용 시약인 Lung acetone powder (Rabbit, 유래) 및 Hippuryl-His-Leu (Acetate Salt)는 Sigma-Aldrich Co. (U.S.A.)의 것을, trinitrobenzene sulfonate (TNBS)는 東京化成 (Japan)의 것을 구입하여 사용하였다. 이외에는 분석용 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

생리 활성 물질의 용매 추출

각 시료별 생리 활성 물질 추출은 상온 또는 열수를 사용하여, Fig. 1, 2와 같이 실시하였다. 먼저 첫 번째 추출법으로 미리 분쇄해 둔 시료 10 g을 처음에는 증류수 100 mL로 상온에서 1 시간씩 교반 추출한 후, 원심분리 (미량원심분리기; Mega

21R) (6,000 rpm, 15°C, 10 min)하여 추출액과 잔사를 얻었다. 이 추출액은 진공 동결 건조시켜 상온수 추출 획분으로 하였으며, 잔사에 대해서는 증류수 1,000 mL를 넣어 water bath (KMC-1205 SW1)에서 추출 (100°C, 1시간)해서 원심분리 (미량원심분리기; Mega 21R, USA) (6,000 rpm, 15°C, 10 min)하여 상등액은 진공 동결 건조시켜 열수 추출획으로 하였고, 잔사는 acetone, methanol 순으로 추출 및 여과 (Toyo filter No.4)하여 각각 acetone 추출구, methanol 추출구를 얻어 회전식 진공증발기 (Rotavator; R-200, Buchi, switzerland)로 농축시켰다. 증류수 추출구는 증류수에 녹여 시료액으로 사용하였고, acetone 추출구는 Acetone (HPLC Grade, UV Cutoff 330 nm)에 녹인 후, 검색용 시료로 사용하였으며, methanol 추출구는 dimethyl sulfoxide (DMSO, C₂H₆SO)에 녹여 모두 냉장 온도에 보관하면서 사용하였다. 두 번째 추출에서는 상온수, ether, acetone, methanol, 열수 순으로 추출하였으며, 각 농축 시료의 용매로는 각각 증류수, acetone, acetone, DMSO, 증류수로 녹여 시료액으로 사용하였다 (Fig. 2).

추출 수율

추출 수율의 측정은 추출에 사용한 시료의 乾物에 대한 추출물의 총 Soluble Solid 함량의 백분비로 하였다.

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Concentraed matter의 weight}}{\text{Soluble solid의 weight}} \times 100$$

항고혈압성 검사

시료의 angiotensin-I converting enzyme (ACE)에 대한 활성 저해능으로써 그 항고혈압성을 나타내었다.

crude ACE solution 조제

crud ACE solution 조제는 Cushman and Cheung (1971)의 방법에 따라 Fig. 3 에서와 같이 조제하였다. 즉, Lung acetone powder (rabbit, Sigma-Aldrich Co.) 1 g에 sodium borate buffer (PH 8.5) 10 mL를 넣어 5°C에서 24시간 교반 후 원심분리 (10,000 rpm, 30 min)한 다음 상등액을 조효소액으로서 취하여 4°C에 보관해두고서 사용하였다.

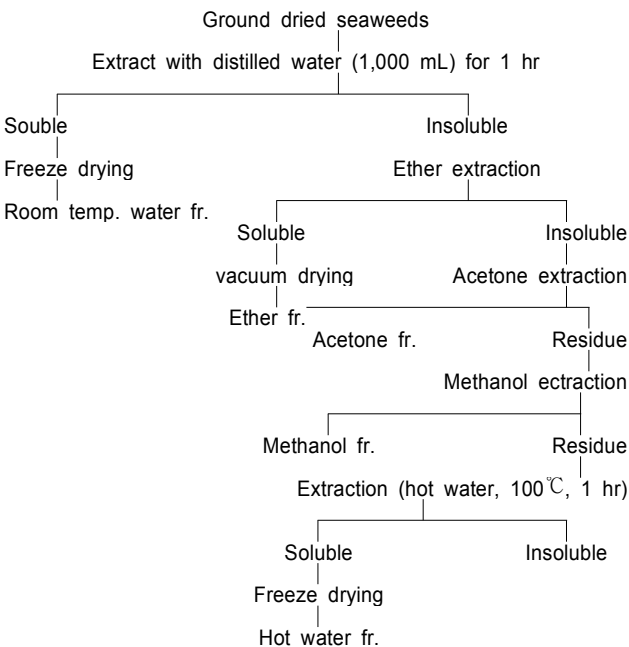


Fig. 2. Second Procedure for the extraction of bioactive compounds from the dried seaweeds.

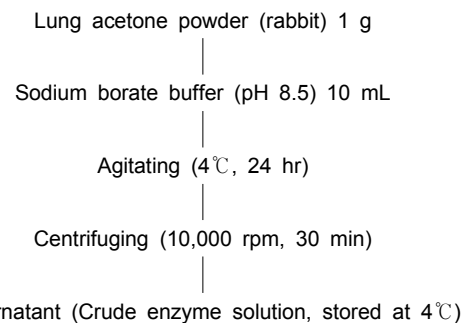


Fig. 3. Flow sheet of procedure for the preparation of crude angiotensin-I converting enzyme (ACE) solution.

Table 1. Procedure for determining ACE inhibitory activity with TNBS

	Vol (μL)		
	Blank	Control	Sample
Inhibitor	-	-	25
H ₂ O	25	25	-
ACE solution	50	50	50
0.5 N HCl	400	-	-
12.5 mM Hip-His-Leu	150	150	150
Incubated at 37°C for 90 min			
0.5 N HCl	-	400	400
Kolthoff buffer ¹	250	250	250
0.1 M TNBS solution	25	25	25
Incubated at 37°C for 20 min			
Sulfite ²	4500	4500	4500
Measured at 416 nm			

¹⁾ 0.1 M Na₂HPO₄ · 1.0 N NaOH (1:2).

²⁾ 4 mM Na₂SO₃ in 0.2 M NaH₂PO₄.

ACE 저해 활성 측정

ACE 저해 활성 측정은 trinitrobenzene sulfonate (TNBS)를 이용한 색도계 측정의 방법 (Matsui et al., 1992)에 따라 Table 1과 같이 사용하였다. 즉, 시료액 25 μL 에 50 μL 의 Hip-His-Leu (2.5 mM in boratebuffer containing 200 mM NaCl, pH 8.3)을 넣은 다음, 앞서 기술한 바와 같이 조제한 ACE 조효소액을 5배 희석한 것, 50 μL 를 넣어 37°C에서 1시간 incubation시켰다. 반응 정지액으로 0.5 N HCl 250 μL 를 첨가하였고, pH는 Kolthoff buffer (0.1 M Na₂HPO₄ : 1.0 N NaOH (1:2)) 250 μL 를 넣어 맞추었으며, 이어 TNBS solution 25 μL 넣은 후, 20분간 incubation하고 sulfite (4 mM Na₂SO₃ in 0.2 M NaH₂PO₄)를 넣어 ultraviolet-visible Spectrophotometer (ultraviolet-visible Spectrophotometer; Beckman England)로 416 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ACE 저해율 (\%)} = \left(1 - \frac{AS - AB}{AC - AB} \right) \times 100$$

AS : 시료 첨가구의 흡광도

AB : 시료 무첨가구의 흡광도

AC : 대조구의 흡광도

분리정제법

항고혈압성 활성이 전반적으로 높았던 추출 획분에 대하여 한외여과법으로 활성물질의 대량 분리정제를 시도하였다. 본 실험에서 사용된 한외 여과 장치는 plate and frame type의 module을 갖는 system (DDS, Japan)으로서, 막 면적은 0.0336 m²이었다. 사용된 막은 FS 61 PP로서 분획 분자량은 20,000이었다. 공급액은 실험이 진행되는 동안 계속하여 교반을 실시하였으며, 항온 circulator를 열교환기와 연결시켜서 module로 들어가기 전에 온도를 일정하게 유지하였다. 실험이 완료된

후에는 filter membrane을 초기 water flux가 회복될 때까지 충분히 물로 세정하였다.

회수율 (Recovery yield)의 계산

투과액으로 회수되는 각 성분의 회수율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Recovery yield (\%)} = C_p / C_F \times 100$$

C_p : 투과액의 고형분 함량

C_F : 처리액의 고형분 함량

결과 및 고찰

시료별 추출 구간에 따른 수율 및 ACE 저해 효과

5종의 시료를 각 용매별로 순차 추출하여 얻은 추출 구간별 수율과 ACE 저해 효과를 조사한 결과는 Table 2, 3 과 같다. 1차 순차 추출 방법에서 (Table 2) 시료 용매 추출 구간별 수율은 상온수 추출 획분에서 양식산 미역이 12.2%로 최소이었고, 자연산 미역이 42.1%로 최대를 나타내어, 평균 수율 34%로 비교적 높은 수율을 보였다. 그러나, 열수, acetone, methanol 추출구의 평균 수율은 각각 10.5%, 3.1%, 2.8% 순으로, 상온수 추출 획분에 비하여 매우 낮은 수율을 나타내었다. 2차 순차 추출방법에서 (Table 3) 시료 용매 추출 구간별 수율은 상온수 추출 획분의 경우 양식산 미역이 13.5%로 최소를 나타내었고, 미역귀가 42.9%로 최대를 나타내어 평균 수율 28.6%로 1차 순차 추출 방법 때와 마찬가지로 비교적 높게 나타났다. 그러나, ether, acetone, methanol, 열수 추출구의 평균 수율은 각각 7.0%, 2.0%, 1.5%, 9.2%로 나타나 상온수 추출 획분에 비해 역시 낮은 수율을 나타내었다. ACE 저해 효과 결과 (Table 2), 첫 번째 순차 추출 방법에서는 다시마의 열수 추출구에서 IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)가 12.4 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮은 농도에서, ACE 저해 효과가 있었으며, 자연산 미역, 양식산 미역, 자연산 다시마, 구멍 쇠미역의 상온수 추출 획분에서 각각

Table 2. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory efficiency of each extracts obtained by 1st extraction experiment

	Room temp.	water	Boiling water	Acetone	Methanol			
	Yield (%)	IC ₅₀ ^{*1} ($\mu\text{g/mL}$)	Yield (%)	IC ₅₀ ^{*1} ($\mu\text{g/mL}$)	Yield (%)	IC ₅₀ ^{*1} ($\mu\text{g/mL}$)		
Natural <i>Underia innatifida</i>	42.1	15.9	9.0	14.4	2.66	177.0	0.3	ND ²
Cultural <i>Underia pinnatifida</i>	12.2	14.9	11.7	9.1	3.6	20.3	0.5	ND
<i>Laminaria japonica</i>	37.7	15.5	12.3	12.4	1.0	110.1	10.4	272.7
Sprophyll of <i>Underia pinnatifida</i>	40.1	ND	8.7	ND	5.4	ND	1.3	ND
<i>Agarum cribrosum</i>	38.2	13.3	10.8	13.3	2.8	317.7	1.6	ND

*¹ IC₅₀ means the sample concentration to inhibit 50% of ACE inhibitory ratio.

*² ND : not detected.

Table 3. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory efficiency of each extracts obtained by 2nd extraction experiment

	Room temp. water		Ether		Acetone		Methanol		Boiling water	
	Yield (%)	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)	Yield (%)	IC ₅₀ ¹ (µg/mL)
Natural <i>Underia innatifida</i>	33.4	21.4	7.8	30.2	0.6	288.5	0.9	ND ²	10.5	16.3
Cultural <i>Underia pinnatifida</i>	13.5	14.4	6.7	68.7	0.3	31.4	0.1	ND	10.2	40.8
<i>Laminaria japonica</i>	30.3	10.4	4.3	103.9	1.0	184.0	1.2	169.4	5.6	10.4
Sprophyll of <i>Underia pinnatifida</i>	42.9	ND	11.5	ND	7.7	ND	3.1	ND	13.4	ND
<i>Agarum cribrosum</i>	23.0	24.0	4.5	150.1	0.6	336.8	2.3	ND	6.1	ND

*1 IC₅₀ means the sample concentration to inhibit 50% of ACE inhibitory ratio.

*2 ND : not detected.

15.9, 14.9, 15.5, 13.3 µg/mL로 높게 나타났으며 자연산 미역, 구멍 쇠미역의 열수 추출구에서도 각각 14.4, 13.3 µg/mL로 높게 나타났다. Acetone 추출구에서는 양식산 미역의 ACE 저해 효과가 20.3 µg/mL로 높게 나타났다. Methanol 추출구에서는 다시마에서만 272.7 µg/mL로 ACE 저해 효과를 보였고, 미역귀는 상온수, 열수, acetone, methanol, 추출구 모두 ACE 저해 효과가 나타나지 않았다. 2차 순차 추출 방법에서 (Table 3) ACE 저해 효과는 1차 순차 추출 방법 때와 같이 다시마의 상온수, 열수 추출구에서 각각 10.4 µg/mL로 높은 효과를 보였고, 상온수 추출구의 경우 자연산 미역, 양식산 미역, 구멍 쇠미역이 각각 21.4, 14.4, 24.0 µg/mL로 비교적 높게 나타났으며, ether 추출구에서는 자연산 미역, 양식산 미역이 30.2 µg/mL, 68.7 µg/mL로 비교적 높은 효과를 보인 반면, 자연산 다시마, 구멍쇠미역은 103.9 µg/mL, 150.1 µg/mL로 미역보다 낮은 효과를 나타내었다. ACE 저해 효과는 acetone 추출구의 경우 양식산 미역이 31.4 µg/mL로 가장 높은 반면, 자연산 미역, 구멍쇠미역이 각각 288.5, 184.0, 336.8 µg/mL로 양식산 미역 추출획분보다 낮았고, methanol 추출구의 경우 자연산 다시마만 169.4 µg/mL를 나타내었다. 열수 추출획분의 ACE 저해 효과는 자연산 미역과 양식산 미역이 각각 16.3 및 40.8 µg/mL로 비교적 높게 나타났고, 미역귀는 1차 순차 추출방법 때와 같이 나타나지 않았다. Abe and Kaneda (1973)은 green laver (*Monostroma nitidum*) 추출물의 흰쥐 혈장 cholesterol 저하 효과에 대한 실험에서 green laver를 ethyl ether, 80% methanol, water, 67% ethanol로 순차 용매 추출하여 항콜레스테롤 효과를 확인한 결과, 쥐의 혈장 콜레스테롤 저하 효과는 물 추출 fraction의 경우 인정되었고, water-insoluble fraction의 경우 다소 인정되었으나, ether fraction의 경우 인정되지 않았다고 보고한 바 있다. 이들 흰쥐 혈장 cholesterol 저하 효과를 보인 두 추출구 분리한 결과 각각 alginine 및 glycine betaine과 β-homo betain이 분리되었다고 보고하였다. 한편 Suzuki et

al. (1983)은 식품 중에 존재하는 ACE 저해제는 가열 처리에 안정하며, 체내에서 흡수가 용이한 저분자 물질로서 그 저해능은 혈압 강하제보다 활성이 낮지만 상시 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대된다고 보고하였다. 본 실험에서도 시료별로 최대 항고혈압성을 가지는 용매 추출구는 전체적으로 극성이 강한 물추출구인 상온수와 열수 추출구에서 높은 효과를 보이며 대체로 해조에서의 항고혈압성분 물질은 비극성 용매 보다는 극성 용매에서 추출되는 물질로 사료되었다.

Table 4. Fractionation of natural *Laminaria japonica* water extracts by ultrafiltration and their ACE inhibitory activities

	weight (Recovery%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Room temp. water extracts (original)	0.2 g	316.5
After ultrafiltration	above 20,000 Da	0.018 g (0.9 g)
	below 20,000 Da	0.1575 g (78.8 g)
Boiling water extracts (original)	0.06 g	93.9
After ultrafiltration	above 20,000 Da	0.0384 g (64.0 g)
	below 20,000 Da	0.0172 g (28.7 g)
Sodium alginate 300		134.6
Sodium alginate 900		111.1
Cellulose		53.1

한외 여과에 의한 생리 활성 물질의 분리 및 회수율 ACE 저해 효과를 IC₅₀ (µg/mL)으로 비교해 본 결과, 대체로 1, 2차 순차 용매 추출 모두 강한 항고혈압성을 나타낸 다시마의 상온수, 열수 추출획분에 대하여 일상식이에 가까운 1차 순차 추출 방법에서 얻어진 자연산 다시마의 상온수, 열수 추출 획분을 분획분자량이 20,000인 한외 여과 장치를 이용하여 분리한 결과는 Table 4와 같다. 각 획분 즉, 다시마 상온수 추출 원액, 다시마의 상온수 추출 여과액 중 분자량이 20,000 이상인 고분자 물질, 분자량이 20,000이하인 저분자 다시마 상온수 추출구, 다시마 열수 추출구 원액, 다시마 열수 여과액 중 분자량이 20,000이상인 것과 다시마 열수 여과액중 분자량이 20,000이하인 저분자 물질로 나누었다. 먼저, 회수율은 다시마 상온수 여과액 중 분자량이 20,000이상인 것은 9%, 분자량이 20,000이하인 것은 79%가 회수되었다. 다시마 열수 원액에서 다시마 열수 여과액 중 분자량이 20,000이상인 것은 64%, 분자량이 20,000이하인 것은 29%로 비교적 높게 회수되었다. Lee et al. (1993)은 다시마 열수 추출물로부터 가용성 저분자량의 정미 성분 분리를 위하여 한외 여과와 diafiltration을 실시하여 투과량의 flux profile과 전체 고형분, 정미 성분의 회수율을 조사한 결과, 한외 여과물의 회수율이 비교적 높았다고 보고하였다. ACE 저해 효과를 보면 IC₅₀ (µg/mL)의 농도가 다시마 열수 추출 획분 중 분자량 20,000이하인 것이 24.9 µg/mL로 그 활성이 가장 높았으며, 다시마 상온수 추출 여과액중 분자

량 20,000이상인 것에서 각각 25.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 42.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 활성이 높았다. 한편, 다시마 상온수 추출 여과액 중 분자량 20,000 이하인 것은 297.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 다소 활성은 다른 획분에 비해 낮았으나 절대값으로 볼 때 다소 강한 활성을 나타내었다. 그 외 해조 중에 존재해 있으리라 여겨지는 alginate와 cellulose에 대해 그 항고혈압성을 측정해 본 결과 sodium alginate 300과 sodium alginate 900, cellulose의 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 농도가 각각 134.6, 111.1, 53.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

분리된 획분에 대한 정성적인 동정시험

자연산 다시마의 물 추출물에 대한 한외 여과로 분리된 획분들의 정성 반응을 살펴 본 결과는 Table 5와 같다. Phenol 성분 검출 지시약인 Folin's reagent 에서는 다시마 상온수 추출 여과액, 열수 추출 여과액 고분자, 저분자 4획분 모두 반응이 없었다. ACE 저해 요인인 peptide 여부는 amino acid와 peptide 성분의 검출 지시약인 ninhydrin reagent로 검출해 본 결과, 다시마 상온수 추출 여과액 분자량 20,000 이하의 획분에서 강하게 검출되었으며, 분자량이 20,000 이상에서도 약간 검출된 것으로 보아 다시마의 저분자 물질인 ACE 저해 peptide가 상온수 추출로 많이 회수 된 것을 알 수 있었다.

Table 5. Qualitative analyses of each fractions isolated from natural *Laminaria japonica* water extracts by ultrafiltration

	Room temp. water extract		Boiling water extract	
	Concentrate (>20,000 Da)	Permeable fr. (<20,000 Da)	Concentrate (>20,000 Da)	Permeable fr. (<20,000 Da)
Folin's reagent	-	-	-	-
Ninhydrin reagent	-	+++	-	-
AgNO_3 solution	-	+++	-	+

* +++ : dark color, + : light color.

Table 6. Quantitative analysis of each fractions isolated from natural *Laminaria japonica* water extracts by ultrafiltration

		Glucose	N	Protein	$\text{NH}_2\text{-N}$
		(mg/mL)	(mg%)	(%)	(mg%)
After ultrafiltration of room temp. water extracts	above 20,000 Da	0	0.0168	0.1050	13.956
	below 20,000 Da	0.0010	0.0182	0.1138	13.375
After ultrafiltration of boiling water extracts	above 20,000 Da	0.0005	0.0238	0.1488	8.14
	below 20,000 Da	0.0002	0.0238	0.1488	14.538

다시마 상온수, 열수 추출 획분 및 한외 여과 획분에 대한 정량 분석

다시마 상온수 및 열수의 한외여과 분획물에 대한 protein, 아미노 질소량을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 다시마의 상온수 추출물 및 열수추출물의 20,000 Da 이상과 이하의 두 획분으로 한외여과 분리 후, 각 획분들에 대한 당이나 질소, 아미노 질소 함량이 두 분자량 그룹들 모두 비슷한 수준을

유지하였다. 그렇지만, 분획물들에 대한 항고혈압활성 측정 결과 (Table 4)에 의하면 다시마 상온수 추출물의 경우 한외여과만으로도 확연한 고효성 획분을 얻을 수가 있고, 상온수나 열수추출물이 고점성이어서 일반 column법에 의한 분리정제는 매우 힘들어 한외여과에 의한 활성물질 분리정제로 큰 의미가 있다고 본다. 한편, 다시마 열수추출물은 수을 면에서 볼 때 단순한 열수추출만으로도 고효성이면서 제법 순도 높은 물질로 얻을 수 있다고 판단되었다. 그러나, 좀더 고압을 가할 수 있는 liquid column 분리 system을 만들어 내어 대량 순수 분리하는 방안을 구축하여 확실한 순수물질로의 분리정제를 앞으로 더욱 시도해 나가야만 하리라 사료된다.

사 사

이 논문은 2010년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2009-0083-638).

참고문헌

- Abe S and Kaneda T. 1973. Studies on the effect of marine products on cholesterol metabolism in rats - VIII. The isolation of hypochole-strolemic substance from green laver. Bull Japan Soc Sci Fish 39, 383-389.
- Ariyoshi Y. 1993. Angiotensin converting enzyme inhibitors from food proteins. Trend in Food Science & Technol May, 139-144.
- Cushman DW and Cheumg HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharm 20, 1637-1648.
- Do JR, Kim SB, Park YH and Kim DS. 1993. Angiotensin - I converting enzyme inhibitory activity by the component of traditional tea materials. Korean J Food Sci Technol 25, 456-460.
- Kim JP. 1974. Development of protein utilization from inedible algae 1 : Separation of crude protein from inedible algae and its amino acids pattern in crude protein. Korean J Food Sci Technol 6, 17-23.
- Kim SB, Lee TG, Park YB, Yeum DM, Kim OK, Do JR and Park YH. 1994. Isolation and characteristics of angiotensin - I converting enzyme inhibitory activity of peptic hydrolyzates of anchovy muscle protein. Bull Korean Fish Soc 27, 1-6.
- Koo JG, Do JR and Woo SJ. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korean. J Korean Fish Soc 28, 227-236.
- Lee JK, Choi HS, Yoon SK and Kim WJ. 1993. Effect of extraction temperature on some quality of sea tangle extract. J Korean Soc Food Nutr 22, 771-776.

- Maruyama S, Miyoshi S and Tanaka H. 1989. Angiotensin - I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus Carica*. *Agric Biol Chem* 53, 2763-2767.
- Matsui T, Matsufuji H and Osajima Y. 1992. Colorimetric Measurement of angiotensin -I converting enzyme inhibitory activity with trinitrobenzene sulfonate. *Biosci Biotech Biochem* 56, 517-518.
- Oshima G, Shimabukuro, H and Nagasawa K. 1979. Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial cillagenase. *Biochim Biophys Acta* 566, 128-137.
- Sakagami R. 1983. *Biochemistry and utilization of seaweeds*. Koseishakoseikaku, Tokyo, Japan 95-100.
- Shigenobu A, Fumi T and Takashi K. 1967. Studies on the effect of marine products on cholesterol metabolism in Rats-VII : The influence of dried purple laver on cholesterol levels of organs and cholesterol excretion in rats. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 33, 1050-1055.
- Son HS, Kim HS, Kwon TB and Ju JS. 1992. Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J Kor Soc Food Nutr* 21, 136-142.
- Suzuki T, Ishikawa N and Meguro H. 1983. Angiotensin I -converting enzyme inhibiting activity in foods : Studies on vasodepressive components in foods. Part. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi* 57, 1143-1146.

2010년 8월 11일 접수

2010년 8월 18일 수정

2010년 10월 4일 수리