

효소적 가수분해를 이용한 청각으로부터 생리활성 물질의 추출 및 가수분해물의 생리활성

이가화 · Mahinda Senevirathne · 안창범 · 제재영[†]
전남대학교 식품공학 · 영양학부

Biological Compounds Extracted from *Codium fragile* by Enzymatic Hydrolysis and Their Biological Activities

Ka-Hwa Lee, Mahinda Senevirathne, Chang-Bum Ahn, and Jae-Young Je[†]

School of Food Technology and Nutrition, Chonnam National University, Jeonnam 550-749, Korea

Abstract

We extracted bioactive materials from *Codium fragile* by enzymatic hydrolysis using four different proteases (Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, and Protamex) and seven different carbohydrases (amyloglucosidase (AMG), Celluclast, Dextrozyme, Maltogenase, Promozyme, Termamyl, and Viscozyme), and evaluated their biological activities such as antioxidant, anti-acetylcholinesterase (AChE), and anti-inflammatory effects. All enzymatic hydrolysates showed good DPPH radical scavenging capacities, in particular, Flavourzyme and Promozyme hydrolysates possessed the highest activity. The two hydrolysates also exhibited strong hydrogen peroxide scavenging activity, Fe²⁺ chelating activity, and reducing power in a dose-dependent manner. Furthermore, the two hydrolysates effectively protected DNA damage induced by hydroxyl radical by measuring the conversion of supercoiled DNA to the open circular DNA. All enzymatic hydrolysates also showed high anti-AChE inhibitory activities in a dose-dependent manner, and did not show any significant cytotoxicity on RAW264.7 cells (p<0.05). In addition, the enzymatic hydrolysates significantly (p<0.05) inhibited lipopolysaccharide induced-nitric oxide production on RAW264.7 cells. These results suggest that the enzymatic extracts from *Codium fragile* would be good source as an ingredient of functional foods.

Key words: *Codium fragile*, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, anti-inflammation, enzymatic hydrolysis

서 론

최근 생명과학 및 의학기술의 눈부신 발전은 급속한 경제 성장으로 인한 개인 생활수준의 향상과 더불어 인간의 평균 수명을 연장시키는데 큰 기여를 하였다. 하지만 서구화된 식 생활과 운동부족으로 인하여 암, 소화기계 질환, 고혈압, 심장질환, 당뇨병 등 각종 성인병이 급증하고 있다(1,2). 이에 따라 국민들의 건강에 대한 관심이 날로 증가하고 있고 건강 기능성 식품에 대한 연구개발도 활발히 이루어지고 있다.

고령화 시대에 가장 문제시 되고 있는 질병은 노화와 여러 퇴행성 질환으로, 이들 질병의 원인은 대부분 대사과정에서 생성된 유해물질의 축적(3), 생체 내 free radical의 과량 생성 및 이에 따른 지질 과산화물의 생성(4) 등으로 알려져 있다. 특히 free radical은 생체 내에서 에너지를 만드는 대사 과정에서 생성되는 피할 수 없는 결과물이며, 짧은 시간 동안 생성과 소멸을 반복하면서 정상적인 세포의 산화를 유발하여 질병 및 노화를 일으킨다고 알려져 있다(5). 일반적으로

로 체내에 생성된 free radical 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 비타민 C 및 E 등의 비효소계 항산화제와 catalase, superoxide dismutase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소 등에 의해서 효과적으로 제거된다. 그러나 발병 상태에서는 활성산소종과 항산화 시스템간의 항상성(homeostasis)이 무너져 과량의 활성산소종이 효율적으로 제거되지 못하고 결과적으로 DNA, 막지질 및 단백질과 같은 생체 고분자들이 활성산소종에 의한 산화적 스트레스에 의한 손상을 입게 되고 결과적으로 암, 당뇨병, 퇴행성 질환 및 염증성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다(6,7).

또한 고령화 시대에 접어들어 따라 퇴행성 질환의 유병률이 증가하고 있고 그중에서 노인성 치매의 발병률이 해마다 증가하고 있는 추세이다. 치매는 알츠하이머성 치매와 혈관성 치매로 구분되며, 그중 알츠하이머성 치매가 전체 치매의 60~70%를 차지할 만큼 치매의 유발 원인 중 가장 높은 비율을 차지하는 퇴행성 뇌신경질환이다. 알츠하이머성 치매의 발병 원인은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만 많은 가설이

[†]Corresponding author. E-mail: jjy1915@jnu.ac.kr
Phone: 82-61-659-3416, Fax: 82-61-659-3419

제기되고 있으며, 그중 가장 유력한 가설로서 아밀로이드 단백질의 과도한 축적을 들 수 있다(8). 아밀로이드 단백질의 과도한 축적은 apoptosis와 free radical의 생성 및 염증 반응을 수반하여 결과적으로 신경세포의 산화적 손상을 유도하여 세포를 파괴한다. 또한 치매 환자는 뇌 신경세포가 감소하여 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)의 함량이 낮은 것으로 알려져 있으며(9), 이에 따라 ACh를 분해하는 acetylcholinesterase(AChE)의 저해 활성을 나타내는 물질이 치매 치료제로 사용되고 있다.

청각(*Codium fragile*)은 녹조식물 청각 속에 속하는 다년생 해조로 오래전부터 우리나라에서 식용으로 애용되어 왔다. 최근에는 청각의 수용성 추출물에서 항균작용, 항암, 항돌연변이 및 면역증강 효과가 있는 것으로 보고되었다(10-12). 따라서 본 연구에서는 청각으로부터 생리활성물질을 효율적으로 추출하기 위해서 효소적 가수분해 방법을 이용하여 친환경적으로 추출하고, 추출된 가수분해물들의 항산화, 항치매 및 항염증 활성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 청각은 여수 수산시장에서 구입하였고, 가수분해물 제조 전까지 냉장하여 보관하였다. 가수분해물 제조에 사용된 단백질 분해 효소는 Alcalase 2.4L FG, Flavourzyme 500MG, Neutrase 0.8L 및 Protamex, 탄수화물 분해 효소 AMG 300L, Celluclast 1.5L FG, Dextrozyme E, Maltogenase L, Promozyme, Termamyl SC 및 Viscozyme은 (주)바이오시스(Busan, Korea)에서 구입하였다. 그 외 생리활성 측정에 사용된 시약인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), gallic acid, EDTA, peroxidase, electric-eel AChE, acetylcholine iodide 및 ferrozine 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

효소적 가수분해물 제조

청각의 효소 가수분해는 Heo 등(13)의 방법에 따라 실행

하였다. 건조된 청각은 분쇄기(1095 Knifetec Mill, Foss Tecator, Hogana, Sweden)를 사용하여 분말로 분쇄한 후, 기질과 효소의 비를 50:1의 비율로 혼합하고 효소별 최적 온도에서 8시간 동안 효소 가수분해 반응을 시킨 후 100°C에서 10분간 끓여 효소를 불활성화 시켰다(Table 1). 가수분해되지 않은 잔류물을 제거하기 위해 추출물을 5000×g에서 20분간 원심분리 하여 동결건조 시킨 후 -20°C에서 실험 전까지 저장하였다.

효소가수분해물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

가수분해물의 총 폴리페놀(total phenolic content, TPC)은 Singleton 등(14)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 30 μL에 150 μL Folin-Ciocalteu reagent를 혼합, 5분간 정치 후 120 μL의 7.5% sodium carbonate를 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량곡선은 gallic acid를 이용하여 작성하였고, 시료 중의 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalents(GAE)/g of extract로 나타내었다.

총 플라보노이드(total flavonoid content, TFC) 함량은 Meda 등(15)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 5 mL와 동일한 양의 2% aluminium trichloride를 잘 혼합한 후 10분간 반응 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. TFC 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 검량곡선을 이용하여 정량하였다.

청각 가수분해물의 항산화 활성

DPPH radical 소거 활성은 Heo 등(13)이 기술한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 각 시료를 다양한 농도로 제조한 다음 시료 0.1 mL와 실험 직전 1.5×10^{-4} M로 제조한 DPPH 용액 0.1 mL을 96-well plate에 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 UV 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydrogen peroxide 소거 활성은 Müller(16)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 다양한 농도의 시료 0.1 mL와 0.02 mL hydrogen peroxide, 0.07 mL 0.1 M phosphate buffer

Table 1. Optimum hydrolysis conditions of particular enzymes

Enzyme	Optimum conditions		Buffer used ¹⁾	Enzyme composition
	pH	Temperature		
Alcalase	7.0	50°C	0.1 M PB ²⁾	An endoprotease
Flavourzyme	7.0	50°C	0.1 M PB	Containing both endoprotease and exopeptidase activities
Neutrase	7.0	50°C	0.1 M PB	An endoprotease
Protamex	7.0	50°C	0.1 M PB	Hydrolysis of food proteins
AMG	4.5	60°C	0.1 M SB ³⁾	An exo-1,4- α -D-glucosidase
Celluclast	4.5	50°C	0.1 M SB	Catalyzing the breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose polymer
Dextrozyme	4.5	60°C	0.1 M SB	A glucoamylase and pullulanase
Maltogenase	5.0	60°C	0.1 N SB	An alpha-amylase
Promozyme	5.0	60°C	0.1 M SB	Debranching enzymes known as pullulanases
Termamyl	6.0	60°C	0.1 M PB	A heat-stable α -amylase
Viscozyme	4.5	50°C	0.1 M SB	Arabanase, cellulase, xylanase, β -glucanase and hemi-cellulase

¹⁾In enzymatic hydrolysis. ²⁾Phosphate buffer. ³⁾Sodium acetate buffer.

(pH 5.0)를 96-well plate에 잘 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 0.03 mL 1.25 mM ABTS와 0.03 mL peroxidase(1 U/mL)를 첨가하였고, 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Reducing power는 Oyaizu(17)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 0.3 mL 0.1 M phosphate buffer(pH 6.6), 0.5 mL 1% potassium ferricyanide를 다양한 농도의 시료 0.2 mL와 잘 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 후 0.5 mL 10% TCA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액 0.5 mL를 취한 후 여기에 0.5 mL의 증류수와 0.1 mL 0.1% FeCl₃를 첨가하여 잘 혼합하고 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ferrous ion 킬레이팅 활성은 Singh 및 Rajini(18) 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 실험직전 제조한 0.1 mL 0.1 mM FeCl₂를 96-well plate에 동일 양의 다양한 농도의 시료와 혼합한 후 30초간 실온에 방치한 후 0.1 mL 0.25 mM ferrozine을 첨가하여 10분간 반응시키고, 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

In vitro DNA damage 보호 효과

Hydroxyl radical에 의한 DNA damage 보호 효과를 다음과 같이 측정하였다. 즉, eppendorf tube에 1 µL의 0.5 µg pBR322 DNA와 2 µL phosphate buffer(pH 7.4), 3 µL의 2 mM FeSO₄, 그리고 4 µL의 30% H₂O₂를 시료와 함께 혼합한 후 Fenton reaction에 의하여 생성된 hydroxyl radical이 DNA를 공격하도록 37°C에서 30분간 반응시켰다(19). 반응 후 반응 용액을 DNA loading dye와 6:1로 혼합한 후 0.8% agarose gel electrophoresis를 통하여 DNA를 전기영동 하였다. Ethidium bromide(EtBr)를 이용하여 전기영동 된 DNA를 염색한 후 UV illuminator를 통하여 DNA band를 확인하였다.

Acetylcholinesterase(AChE) 저해 활성

AChE 저해 활성은 Ellman 등(20)의 방법으로 측정하였다. 시료 20 µL와 140 µL의 100 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0), 및 20 µL의 AChE(0.36 U/mL)를 혼합하여 15분간 실온에서 반응시킨 후, 10 µL의 0.5 mM DTNB와 10 µL의 0.6 mM ACh를 첨가하였다. 효소반응 결과, ACh의 분해로 생성된 thiocholine과 DTNB의 반응으로 생성된 노란색의 5-thio-2-nitrobenzoate anion의 양을 412 nm에서 측정하였다.

RAW264.7 세포주를 이용한 nitric oxide(NO) 소거 활성

RAW264.7 세포주에 대한 세포 독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. NO의 생성을 위해서 RAW264.7 세포주에 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 자극하였다. 즉, 96-well plate에 RAW264.7 세포주를 1×10⁵ cells/well로 분주하여 16시간 동안 배양한 후 시료와 10 µL LPS를 동시에 첨가하여 24시간 배양시켰다. 배양시킨 혼합물의 상등액 50

µL에 Griess reagent 50 µL(1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine와 5% phosphoric acid)을 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrate(NaNO₂)를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 정량하였다.

통계처리

본 연구의 실험결과는 3회 반복 측정된 후 평균과 표준편차를 나타내었으며, Student's *t*-test를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

청각 가수분해물의 총 폴리페놀(TPC) 및 플라보노이드(TFC) 함량

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 Table 2에 나타내었다. 가수분해물의 TPC 함량은 효소에 따라 차이를 보였으며, 단백질 가수분해물에서는 Flavourzyme 가수분해물을 제외한 나머지 효소 분해물이 13~15 mg GAE/g 내외로 비슷한 함량을 나타내었다. 탄수화물 가수분해물의 경우 대부분이 단백질 가수분해물보다 낮은 TPC 함량을 나타내었다. Promozyme의 경우 13.3 mg GAE/g 내외로 단백질 가수분해물과 비슷한 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 TPC에 비하여 매우 낮은 함량을 나타내었으며, 단백질 가수분해물이 탄수화물 가수분해물보다 조금 높은 값을 보였다.

청각 가수분해물의 항산화 활성

DPPH radical 소거 활성은 수소 혹은 전자공여능을 측정하는 것으로 전자가 쌍이 되어 비 라디칼이 되면서 특유한 색이 소멸되는 원리를 이용하여 항산화능을 측정하는 가장 일반적이고 빠른 방법이다(21). 즉, DPPH radical의 보라색 소멸정도에 따라 시료의 항산화 물질 존재에 의한 라디칼 소거능을 측정하여 나타내었다. Fig. 1A에 나타낸 바와 같이 2.5 mg/mL의 농도에서 청각의 단백질 가수분해물의 DPPH

Table 2. Total phenolic and flavonoid contents in enzymatic hydrolysates from *Codium fragile*

Enzyme hydrolysates	Content (mg/g extracts)		
	TPC ¹⁾	TFC ²⁾	
Proteases	Alcalase	14.45±0.48	0.50±0.03
	Flavourzyme	8.04±0.29	0.72±0.05
	Neutrase	12.74±0.18	0.71±0.20
	Protamex	12.50±0.16	0.74±0.27
Carbohydrases	AMG	8.14±0.40	0.52±0.12
	Celluclast	4.14±0.02	0.40±0.00
	Dextrozyme	5.85±0.25	0.52±0.09
	Maltogenase	2.17±0.09	0.56±0.12
	Promozyme	13.34±0.27	0.86±0.44
	Termamayl	1.44±0.13	0.38±0.07
	Viscozyme	4.06±0.33	0.46±0.13

¹⁾Total phenolic content.

²⁾Total flavonoid content.

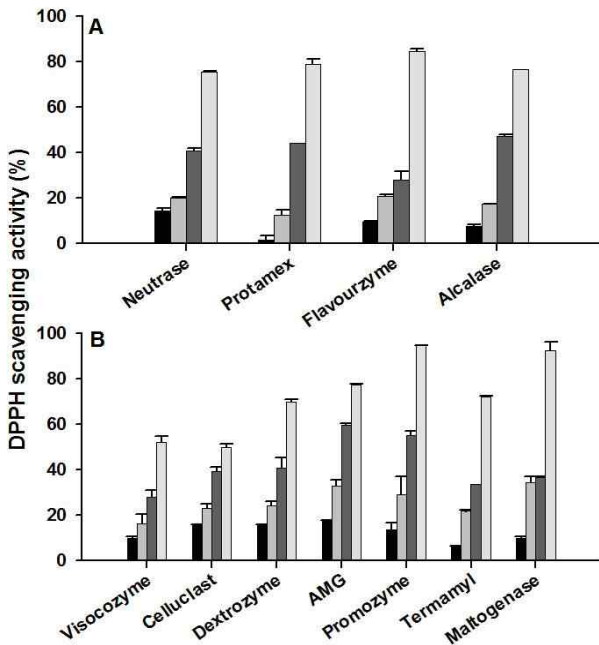


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysates from *Codium fragile*. (A) Protease hydrolysates. (B) Carbohydrase hydrolysates. Values are the means±SD of three determinations. ■ 0.25 mg/mL, ■ 0.50 mg/mL, ■ 1.25 mg/mL, and ■ 2.50 mg/mL.

radical 소거 활성은 Flavourzyme> Alcalase> Protamex> Neutrase 순으로 모두 약 80% 내외의 우수한 소거 활성을 나타내었으며, 특히 가장 높은 활성을 보인 Flavourzyme 가수분해물은 약 85%의 소거능을 나타내었다. Fig. 1B에는 청각의 탄수화물 가수분해물의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 단백질 가수분해물과 동일하게 모두 농도 의존적으로 높은 활성을 나타내었고, 그중 Promozyme 가수분해물은 90% 이상의 소거 활성으로 단백질과 탄수화물 가수분해물 중 가장 강력한 활성을 나타내었으며, 그 뒤로 Maltogenase> AMG> Termamyl> Dextrozyme> Viscozyme> Celluclast 가수분해물 순으로 소거 활성을 나타내었다.

청각 가수분해물의 DPPH radical 소거 활성은 사용한 효

소에 따라 활성 차이가 있었으나 대부분 높은 활성을 나타내었다. 이는 해조류의 수용성 항산화물에서 김과 청각이 DPPH radical 소거활성이 아주 미미하거나 없다는 Lee 등 (22)의 보고와 비교할 때 상반되는 결과이나, 김과 청각의 추출방법에 따라 차이가 있는 것으로 보인다. 본 연구에서는 효소를 사용하여 청각 가수분해함으로써 DPPH radical을 소거할 수 있는 생리활성 물질을 다량 추출할 수 있었음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 바탕으로 단백질 및 탄수화물 가수분해물에서 가장 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 가수분해물을 1종씩 선택하여 다음 실험을 진행하였다. Fig. 2는 hydrogen peroxide 소거 활성, Fe²⁺ 킬레이팅 및 reducing power를 측정된 결과이다. Hydrogen peroxide는 상대적으로 반응성이 적으나 전이금속 등과 반응하여 세포의 구성 성분 손상을 유발하는 반응성이 큰 hydroxyl radical 및 singlet oxygen으로 전환되기 때문에 hydrogen peroxide에 대한 소거 활성 측정은 산화방지제의 기능을 결정하기 위한 유용한 방법 중 하나이다. Fig. 2A에 나타나듯이 두 가수분해물 모두 높은 hydrogen peroxide 소거 활성을 나타내었고 농도 의존적으로 활성이 상승하였다. Fe²⁺와 같은 금속 이온은 세포 내에서 산화제의 구성에 중요한 역할을 한다. Fe²⁺ 등과 같은 금속이온의 적절한 제거는 세포 내에서 산화제의 생성을 억제할 수 있는 좋은 방법이다. Fe²⁺ 이온은 ferrozine과 반응하여 보라색 복합체를 형성하는데, 시료 중에 항산화 성분이 있으면 ferrozine과 경쟁적으로 반응하여 Fe²⁺-ferrozine 복합체의 생성을 억제하고 결과적으로 보라색이 줄어든다. Fig. 2B와 같이 Promozyme 가수분해물이 Flavourzyme 가수분해물보다 우수한 Fe²⁺ 킬레이팅 효과를 나타내었다. 항산화 성분에 의한 Fe²⁺ 킬레이팅 효과는 ROS의 생성을 억제하여 세포 구성 성분의 산화적 손상을 막는다. 또한, 지질 과산화물 생성에 있어서 촉매 역할을 하는 전이금속의 농도를 줄이기 때문에 금속 이온 킬레이팅은 중요한 항산화 기작으로 알려져 있다(23). Fig. 2C는 청각 가수분해물의 reducing power를 측정된 결과이다. Free radical 및

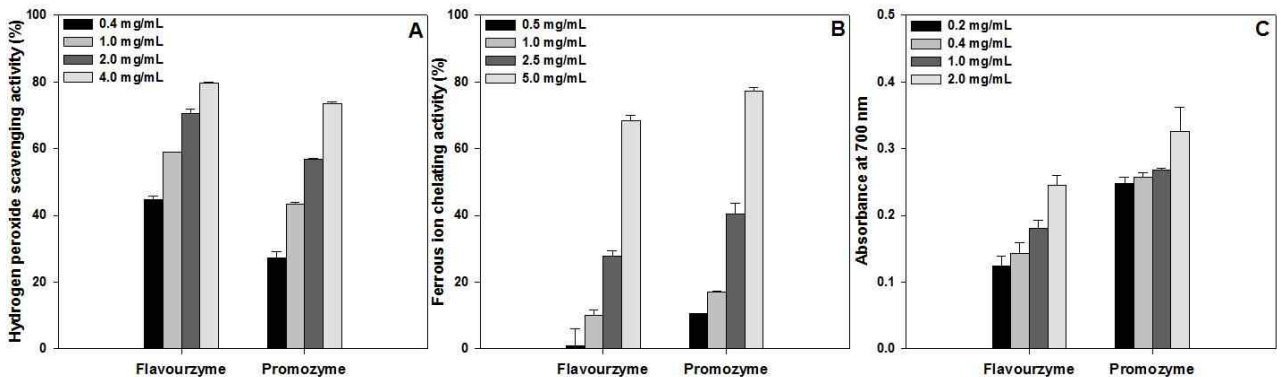


Fig. 2. (A) Hydrogen peroxide scavenging, (B) Ferrous ion chelating, and (C) Reducing power of enzymatic hydrolysates from *Codium fragile*. Values are the means±SD of three determinations.

ROS에 의한 세포 구성성분의 산화는 결과적으로 많은 질병과 관련이 있다. Reducing power는 Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온으로 환원시키는 원리를 이용하여 시료 중에 전자의 공여 능력을 측정하는 원리이다. 청각의 단백질 및 탄수화물 가수분해물 모두 우수한 reducing power를 나타내었으며, Promozyme 가수분해물이 단백질 가수분해물보다 우수한 reducing power를 나타내었다. 본 연구에서는 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene)를 positive control로 사용하였으며 측정 결과 청각 가수분해물이 BHT보다 낮은 항산화력을 나타내었다. 그러나 안전성문제가 대두되고 있는 합성 항산화제인 BHT보다 오래전부터 식용으로 애용된 청각을 이용한 안전한 수용성 항산화제의 개발이 기대된다.

Hydroxyl radical로 유도된 DNA damage 보호 효과

ROS에 의한 산화적 손상에 있어서 생체고분자 중 DNA는 가장 민감한 biotarget이다(24). ROS에 의한 DNA의 손상은 암을 유발할 수 있고 파킨슨병과 알츠하이머성 치매 등과 같은 퇴행성 신경질환의 발병에 있어서도 특징적인 결과이다. ROS 중에서도 hydroxyl radical은 생리학적으로 가장 중요한 DNA 손상 물질로 알려져 있다(25). 본 연구에서는 hydroxyl radical을 hydrogen peroxide와 Fe^{2+} 에 의한 Fenton reaction으로 제조하였고 hydroxyl radical에 노출된 DNA는 supercoiled(SC) 형태의 DNA가 open circular(OC) 형태의 DNA로 전환되며 시료 중에 금속 이온 킬레이팅제, 항산화제, radical 소거제 및 catalase 등이 존재할 시 OC 형태의 DNA로의 전환을 억제할 수 있다. 청각 가수분해물 중 항산화 활성이 우수한 Flavourzyme 및 Promozyme 가수분해물의 hydroxyl radical로 유도된 DNA 손상 보호 효과를 Fig. 3에 나타내었다. Lane 1(control)에는 SC 형태의 DNA가 정상적으로 관찰되었으나, lane 2와 같이 hydroxyl radical에 의해서 손상된 DNA는 OC 형태의 DNA가 많이 관찰되었다. 그러나 Flavourzyme 및 Promozyme 가수분해물을 처리한 군에서는 농도가 높아질수록 OC 형태의 DNA로의 전환을 효과적으로 억제할 수 있었다. 즉, 가수분해물이 SC 형태의 DNA를 공격할 수 있는 hydroxyl radical, hydrogen peroxide 및 Fe^{2+} 를 효율적으로 제거해 DNA의 손상을 억제

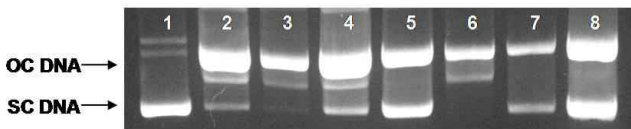


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmid DNA breaks induced by hydroxyl radical generated from Fenton reaction in the presence of *Codium fragile*. A 0.5 μ g of pBR 322 DNA was incubated at 37°C for 30 min in 2 mM $FeSO_4$ and 10 mM H_2O_2 with the following additive combinations: (A) lane 1, no addition (plasmid DNA control); lane 2, $FeSO_4$ and H_2O_2 (DNA damage control); lanes 3~5, $FeSO_4$ and H_2O_2 with Flavourzyme hydrolysates (1.25, 2.0 and 4.0 mg/mL); lanes 6~8, $FeSO_4$ and H_2O_2 with Promozyme hydrolysates (1.25, 2.0 and 4.0 mg/mL).

함을 알 수 있었다.

AChE 저해 활성

알츠하이머성 치매 환자의 1차적 증상인 인지기능저하는 콜린성 신경세포 수의 저하 및 ACh의 분비능력저하가 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 신경세포의 퇴화로 인한 ACh의 생성 저하와 함께 ACh를 분해하는 AChE의 증가를 유발하여 알츠하이머성 치매 증상을 악화시키는 것으로 알려져 있다(26,27). 청각 단백질 및 탄수화물 가수분해물들의 AChE 저해 활성은 Fig. 4에 나타내었다. 단백질 가수분해물의 경우 Flavourzyme 가수분해물이 90% 이상의 가장 높은 AChE 저해 활성을 나타내었고, 그 다음으로 Alcalase, Neutralse 및 Protamex 순으로 AChE 저해 활성이 나타났다. 탄수화물 가수분해물의 경우 Dextrozyme 가수분해물이 가장 높은 AChE 저해 활성을 나타내었고, 그 다음으로 Termamyl, Celluclast, AMG, Promozyme, Maltogenase 및 Viscozyme 순으로 나타났다. 단백질 및 탄수화물 가수분해물 모두 농도 의존적으로 AChE 저해 활성을 나타내어, 알츠하이머성 치매를 예방하는 기능성식품 소재로 활용 가능할 것으로 판단된다.

NO 소거 활성

생체내에서 NO는 주로 면역에 관여하는 세포에서 생성되며, 체내 면역반응에서 가장 중요한 기작 중 하나이다. 그러나 과량 생성된 NO는 염증 질환, 퇴행성 신경질환, 당뇨병 및 패혈성 쇼크 등과 같은 질병과 밀접한 관련이 있다(28). NO는 NO 합성 효소인 inducible nitric oxide synthase

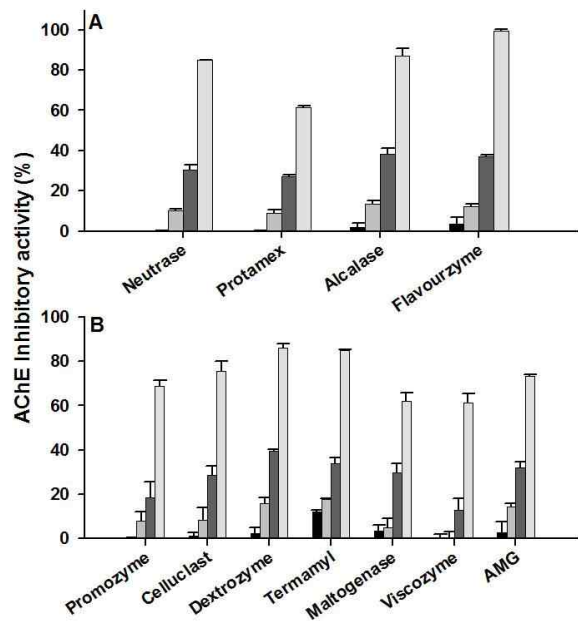


Fig. 4. AChE inhibition activities of enzymatic hydrolysates from *Codium fragile*. (A) Protease hydrolysates. (B) Carbohydrase hydrolysates. Values are the means \pm SD of three determinations. ■ 0.05 mg/mL, ■ 0.10 mg/mL, ■ 0.25 mg/mL, and ■ 0.50 mg/mL.

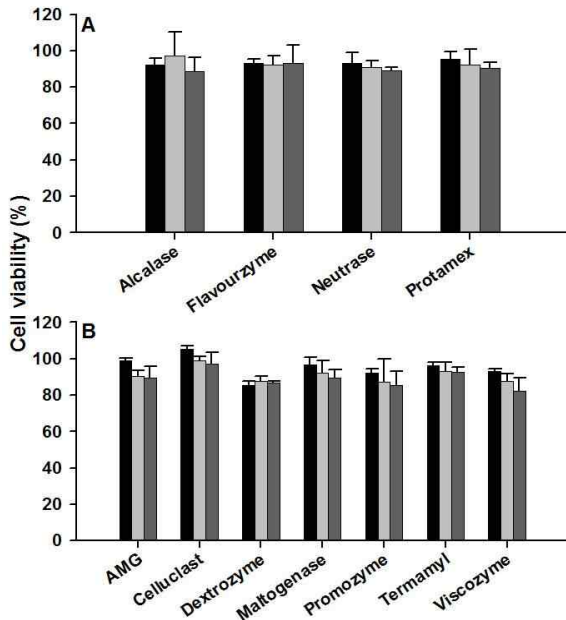


Fig. 5. Effects of cell viability of enzymatic hydrolysates from *Codium fragile*. (A) Protease hydrolysates. (B) Carbohydrase hydrolysates. Values are the means \pm SD of three determinations. ■ 0.05 mg/mL, ■ 0.10 mg/mL, and ■ 0.25 mg/mL.

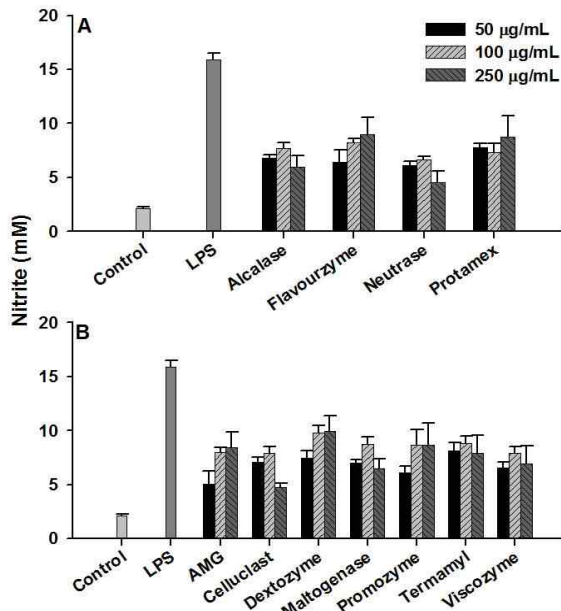


Fig. 6. Inhibition of LPS induced-NO production in RAW 264.7 cells by enzymatic hydrolysates from *Codium fragile*. (A) Protease hydrolysates. (B) Carbohydrase hydrolysates. Values are the means \pm SD of three determinations.

(iNOS)에 의해서 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 생성된다. 특히 대식세포에서 iNOS의 활성은 외부 감염 또는 다양한 염증 상태일 때 높아져 과량의 NO를 생성하게 된다. 따라서 대식세포에서 과량 생성된 NO는 해로울 수 있으며, 염증성 질환이나 자가 면역질환을 야기할 수 있어 NO의 생성 억제는 중요하다(29).

NO의 생성 억제능을 측정하기 전에 사용한 세포주에 대한 세포 독성을 먼저 측정하였다. 먼저 RAW264.7 세포주를 키워 96 well plate에 seeding 한 후 18시간 후에 다양한 농도의 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT 용액을 처리하여 4시간 동안 배양한 후 보라색 결정을 DMSO에 녹여 흡광도를 측정하여 세포독성을 검토하였다. Fig. 5와 같이 청각의 단백질 및 탄수화물 가수분해물 모두 처리한 농도에서 RAW264.7 세포주에 대한 세포독성이 나타나지 않았다. RAW264.7 세포주에서 NO를 생성하기 위해서 LPS로 자극하였다. Fig. 6과 같이 LPS만 처리한 군에서는 control군과 비교하여 높은 NO 생성을 나타냄을 알 수 있었다. 그러나 청각 단백질 및 탄수화물 가수분해물을 미리 처리한 군에서는 LPS로 유도된 NO의 생성이 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과에 따라, 청각 가수분해물은 염증성 질환을 억제하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 청각으로부터 생리활성물질을 추출하기 위해서 친환경적인 효소적 방법을 이용하여, 이들 효소 가수분해물의 TPC, TFC, 항산화 활성, acetylcholinesterase (AChE) 저해 활성 및 항염증 활성을 측정하였다. 청각의 단백질 및 탄수화물 가수분해물의 TPC는 TFC보다 높은 함량을 나타내었으며, 단백질 가수분해물이 탄수화물 가수분해물보다 높은 TPC를 나타내었다. 청각 가수분해물의 항산화 활성은 DPPH radical 소거 활성으로 측정하였고, 단백질 가수분해물에서는 Flavourzyme 가수분해물이 활성이 높았고, 탄수화물 가수분해물에서는 Promozyme 가수분해물이 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 따라서 두 가지 가수분해물을 이용하여 hydrogen peroxide 소거능, Fe²⁺ 킬레이팅 및 reducing power를 측정한 결과 두 가수분해물 모두 우수한 항산화 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한, hydroxyl radical로 유도된 DNA 손상을 효과적으로 억제하였다. AChE 저해 활성에서는 Flavourzyme 및 Dextrozyme 가수분해물이 각각 우수한 AChE 저해 활성을 나타내었다. 청각 가수분해물의 RAW264.7 세포주에 대한 세포독성을 검토한 결과 세포독성을 나타내지 않았으며, lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 nitric oxide(NO) 생성 억제능에서는 모든 가수분해물이 유의적($p < 0.05$)으로 NO의 생성을 억제하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 소관 수산특정연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. Kim HB. 2000. Sensory characteristics of mulberry fruit jam and wine. *Korean J Seri Sci* 42: 73-77.
2. Kim HB, Lee YW, Lee YJ, Moon JY. 2001. Physiological effects and sensory characteristics of mulberry fruit wine with Chongilpong. *Korean J Seri Sci* 43: 16-20.
3. Kawashima S. 1969. The possible role of lipoperoxide in aging. *Nagoya J Med Sci* 32: 303-326.
4. Dicker EA, Crum AD, Calvert JT. 1992. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J Agric Food Chem* 40: 756-759.
5. Yu BP. 1996. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21: 651-681.
6. Pryor WA, Ann NY. 1982. Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Acad Sci* 393: 1-22.
7. Butterfield DA, Castenga A, Pocernich CB, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's diseases. *J Nutr Biochem* 13: 444-461.
8. Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487-498.
9. Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Russel RW, Symon L. 1975. Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol* 32: 632-637.
10. Katayama T. 1964. Biochemical significance of the existence of acrylic acid in algae. *Jap Soc Phycol* 12: 14-19.
11. Ryu BH, Chi BH, Kim DS, Ha MS. 1986. Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. *Bull Korean Fish Soc* 19: 502-508.
12. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull Korean Fish Soc* 23: 345-352.
13. Heo SJ, Lee KW, Song CB, Jeon YJ. 2003. Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18: 71-81.
14. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
15. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571-577.
16. Müller HE. 1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on an ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bacteriol Microbiol Hyg* 259: 151-158.
17. Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
18. Singh N, Rajini PS. 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem* 85: 611-616.
19. Yeung SY, Lan WH, Huang CS, Lin CP, Chan CP, Chang MC. 2002. Scavenging property of three cresol isomers against H₂O₂, hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol* 40: 1403-1413.
20. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
21. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Preserv* 15: 587-592.
22. Lee BH, Choi BW, Chun JH, Yu BS. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J Korean Ind Eng Chem* 7: 1069-1077.
23. Duh PD, Tu YY, Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harg Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT-Food Sci Technol* 32: 269-277.
24. Martinez GR, Loureiro APM, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, Almeida EA, Garcia CCM, Barbosa LF, Medeiros MHG, Di Mascio P. 2003. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res* 544: 115-127.
25. You HJ, Oh DH, Choi CY, Lee DG, Hahm KS, Moon AR, Jeong HG. 2002. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1573: 33-38.
26. Kuhl DE, Koeppe RA, Minoshima S, Snyder SE, Ficaró EP, Foster NL, Frey KA, Kilbour MR. 1999. *In vivo* mapping of cerebral acetylcholinesterase activity in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52: 691-699.
27. Costagli C, Galli A. 1998. Inhibition of cholinesterase associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents: focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 55: 1733-1737.
28. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs DA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
29. Southan GJ, Szabo C. 1996. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 51: 383-394.

(2010년 3월 15일 접수; 2010년 4월 27일 채택)