

## 한국산 다슬기류 (*Semisulcospira* spp.) 5종의 항산화 활성

이문희·김연계\*·문호성·김유아·윤나영·임치원·박희연·김대희<sup>1</sup>

국립수산과학원 식품안전과, <sup>1</sup>중앙내수면연구소

### Antioxidant Activities of Five *Melania* Snails of the Genus *Semisulcospira* in Korea

Moon-Hee Lee, Yeon-Kye Kim\*, Ho Sung Moon, You Ah Kim,  
Na Young Yoon, Chi-Won Lim, Hee-Yeon Park and Dae-Hee Kim<sup>1</sup>

Food and Safety Division, National Fisheries Research & Development Institute,  
Busan 617-705, Korea

<sup>1</sup>Central Regional Inland Fisheries Research, National Fisheries Research &  
Development Institute, Gyeonggi 477-815, Korea

The *in vitro* antioxidant activities of five melania snails in the genus *Semisulcospira* (*S. coreana*, *S. forticosta*, *S. libertina*, *S. tegulata* and *S. gottschei*) were tested in detail. The total phenolic contents of the snails ranged from 32.3±1.0 to 87.9±6.9 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry sample. The EC<sub>50</sub> values for the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities were 2.245±0.179 mg/mL for *S. coreana* and 9.319±1.276 mg/mL for *S. gottschei* and differed significantly ( $P<0.05$ ) among the tested species. The superoxide dismutase (SOD)-like activity was highest for *S. gottschei* at 67.2% and lowest for *S. forticosta* at 4.7%. However, no significant differences among the species were recognized for the peroxynitrite anion scavenging activity. Comparing the correlation coefficients between the total phenolic contents and the DPPH radical and peroxynitrite anion scavenging activities, there was a low level relationship between each activity.

Key words: *Melania* snail, Antioxidant activity, DPPH radical scavenging, Total phenolic content, SOD-like activity

#### 서 론

항산화 물질은 지질이나 다른 분자들의 산화를 초기에 억제하거나 산화 체인반응의 연속성을 억제시키는 화합물로 알려져 있으며 (Velioglu et al., 1998), 지질, 단백질 및 핵산 등의 활성산소 종들에 의한 산화적 손상은 심장병, 동맥경화, 암과 노화와 같은 다양한 만성 질병의 원인이 될 수 있다 (Finkel and Holbrook, 2000). 또한 역학적 연구의 결과, 항산화 물질은 과일 및 채소의 섭취가 노화, 심장병, 암과 같은 질병에 의한 사망률과 연관성이 있으며 이는 그들의 항산화 활성과 깊게 연계하는 결과도 보고되고 있다 (Li et al., 2007). 현재 산업계에서 많이 사용하고 있는 항산화제로는 천연 항산화제인 토코페롤과 합성 항산화제인 propyl gallate, BHA, BHT, TBHQ (tertiary butylhydroquinone) 등이 있다. 일반적으로 페놀계 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHA와 BHT는 그 효과와 경제성 그리고 안전성 때문에 많이 사용되어 왔지만, 합성 식품첨가물의 일반적인 기피 현상과 과량 섭취 시 인체에 독성 작용을 일으키는 것으로 알려져 대체 항산화제의 개발이 요구되고 있다 (Ryu and Hwang, 1990). 따라서 천연에서 기원한 안전하고 지속적으로 사용할 수 있는 새로운 항산화제의 개발은 중요하다.

다슬기는 우리나라 하천이나 호수 등지에서 흔히 볼 수

있는 고등류로 시냇가에서 손쉽게 채취할 수 있는 패류이기 때문에 일찍이 우리나라에서는 많이 식용되어 왔다. 또한 다슬기 국은 뱃속을 편안하게 하고 소화를 잘되게 하며 간을 보호하고 빈혈증의 치료에 좋다고 알려져 있다 (Kim et al., 1985). 다슬기를 끓이면 과란 물이 우러나는데 이는 다슬기를 비롯한 조개류의 먹이생물인 식물성 플랑크톤에 기원하는 것으로 판단되며, 이 푸른색 추출물은 사람의 간질환을 치료 하는데 매우 좋은 효과가 있어 우리나라에서는 일찍이 민간요법으로 다슬기를 이용하여 식용하거나 국물의 맛을 살리기 위해 많이 이용하여 왔다 (Kim, 1999). 또한, Kim et al. (2009)은 국내산 7종 다슬기 추출물의 생리활성에 대하여 비교 평가하여 각종 기능성 식품소재 후보군으로서의 가능성을 제시하였으며, 다슬기의 DPPH radical 소거능이 종에 따라 다소 차이가 있음을 발표하였다.

따라서 본 연구에서는 다슬기의 항산화활성 즉 페놀함량, 전자공여능, SOD 유사활성, 환원력, peroxynitrite anion 소거능 등에 대하여 상세히 평가하고 각각의 상관관계를 검토함으로써 다슬기 항산화활성에 대한 기초 자료를 제공하고 산업적 이용가능성을 검토하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 재료 및 시약

본 실험에서 이용한 *Semisulcospira* spp. 5종 다슬기 [S.

\*Corresponding author: yeonkyekim@korea.kr

*coreana* (참다슬기), *S. forticosta* (주름다슬기), *S. libertina* (다슬기), *S. tegulata* (좁주름다슬기), *S. gottschei* (꽃체다슬기)]는 우리나라 각 지역의 하천에서 서식하는 것을 채취하여 사용하였다. 즉, 춘천지역에서 *S. coreana*와 *S. gottshcei*, 문경지역에서 *S. forticosta*와 *S. tegulata* 그리고 청송지역에서 *S. libertina*와 같이 각 지역에서 다량으로 채취 가능한 다슬기를 이용하였다.

본 실험에 사용된 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-ciocalteu's phenol reagent, potassium ferricyanide, pyrogallol, gallic acid, L-ascorbic acid는 Sigma-Aldrich Inc. (Saint Louis, USA), peroxyntirite와 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)에서 구입하였으며, 그 외의 시약은 특급시약을 특별한 정제과정 없이 사용하였다. 분석에 이용된 UV-visible spectrophotometer는 Thermo electron사의 Bio-Mate 5 (Waltham, USA)를 사용하였고, ELISA plate reader기는 Bio-Tek사 Powerwave XS (Winooski, USA)와 Perkin Elmer사의 Wallac 1420 (Turku, Finland)을 사용하였다.

#### 추출물 조제 및 수율

각 다슬기는 채취한 후 껍질을 깨어 가식부만 동결건조하여 사용하였다. 다슬기 추출물의 조제를 위하여 각각의 다슬기 동결건조 시료 1 g에 10 mL의 메탄올을 첨가하여 실온에서 3시간 동안 3회 반복하여 추출하였다. 각 시료 추출액은 automatic multi parallel sample evaporation system (Büchi syncore, Flawil, Switzerland)을 이용하여 증발시킨 후 추출 수율을 구하고, 증발건조 시료는 다시 메탄올로 용해하여 농도 (100 mg/mL)를 맞춘 후 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

#### 총 페놀 화합물 함량

각 시료의 메탄올 추출물은 100 mg/mL의 농도로 조정하여 Folin-Denis 법 (Cheung et al., 2003)으로 측정하였다. 즉, 각 농도의 시료 0.05 mL에 2% Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> 용액 1 mL를 첨가하고 vortex하여 실온에서 2분간 방치 한 다음 50% Folin-ciocalteu's phenol reagent 0.05 mL을 첨가하여 실온에서 30분간 방치 한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, blank는 50% Folin-ciocalteu's phenol reagent 대신 증류수를 가한 혼합액을 사용하였으며, 표준곡선은 gallic acid를 0.002-0.227 mg/mL의 농도로 조제하여 측정 후  $y = 16.442x + 1.265$  ( $R^2 = 0.9998$ )의 수식을 이용하여 검량하였다. 모든 실험의 검량 값은 동일한 실험을 3회 반복하여 평균한 값으로 나타내었다.

#### DPPH radical 소거 활성

각 다슬기 추출물의 DPPH radical 소거능은 Blios의 방법 (Blios, 1958)에 따라 측정하였으며, 전자공여능 (Electron donating ability; EDA (%))으로 나타내었다. 즉 0.4 mM DPPH methanol soln. 0.15 mL에 실험 농도로 희석한 시료 0.1 mL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 기존의 항산화제로 알려진 gallic acid를 이용하였으며 위와 동일한 방법에 의하여 DPPH radical

에 전자를 공여함으로써 free radical을 소거하는 활성을 측정하였다.

$$\text{EDA (electron donating ability, \%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{blank}}$  : 무처리군의 흡광도      $\text{Abs}_{\text{sample}}$  : 시료군의 흡광도

#### Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

SOD 유사활성은 pyrogallol의 자가산화 (auto-oxidation)를 저해하는 정도로 확인하였다 (Marklund and Marklund, 1974). 즉, pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl]amino-methane) 3.0 mL에 적당히 희석한 시료 0.2 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 이용하였으며, 각 시료가 나타내는 SOD 유사활성은 시료 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율 (%)로 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{blank}}$  : 무처리군의 흡광도      $\text{Abs}_{\text{sample}}$  : 시료군의 흡광도

#### Reducing power

각 시료 추출물의 reducing power는 Oyaizu의 방법 (Oyaizu, 1986)에 따라 측정하였다. 먼저, 각 실험 농도별로 조제한 시료 2.5 mL에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 mL와 potassium ferricyanide (10 mg/mL) 2.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 100 mg/mL trichloroacetic acid (TCA) 2.5 mL를 첨가하였다. 이어서, 반응액을 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액 5 mL를 취하고 증류수 5 mL, 1 mg/mL ferric chloride 1 mL를 잘 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid를 이용하여 동일한 방법으로 측정하였으며, 모든 실험은 3회 반복하여 평균값을 사용하였다. EC<sub>50</sub> 값은 흡광도 0.5에 대응하는 값으로 나타내었다.

#### Peroxyntirite anion 소거 활성

Peroxyntirite anion 소거 활성은 Kooy et al. (1994)의 방법에 따라 DHR 123이 산화되는 정도로 측정하였다. DHR 123 (5 mM)은 dimethylformamide로 녹여서 질소로 purge한 후에 -8 0°C에 보관하였으며, DHR 123 (5 μm) 희석 용액은 암실의 얼음 위에서 사용하기 직전에 조제하여 사용하였다. 실험에 이용되는 반응액 (200 μL)은 90 mM sodium chloride와 5 mM potassium chloride를 포함하는 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 diethylentriaminepenta acetic acid (DTPA)를 100 μm로 혼합하고 DHR 123용액을 5 μm이 되게 혼합한 후 실험 농도로 희석한 시료 10 μL와 200 μm peroxyntirite 10 μL를 첨가하여 사용하였다. Peroxyntirite anion 소거활성은 상기의 반응액을 실온에서 5분간 반응시킨 후 excitation 파장 485 nm과 emission 파장 530 nm로 하여 실온에서 측정하였다

(Perkin Elmer Victor3 1420 multilabel counter, Finland). 각 실험에 대한 positive control은 L-ascorbic acid를 사용하였고 negative control로는 ONOO<sup>-</sup> 용액 대신 0.3 N NaOH 만을 사용하였으며, 무첨가군의 흡광도를 측정하기 위해 시료 대신 시료 용매만을 사용하여 실험하였다. 각 실험값은 3번 반복한 결과를 평균하여 계산하였다. 실험에 사용한 *Semisulcospira* spp. 5종 다슬기 메탄올 추출물의 peroxynitrite 소거능은 시료 추출물의 첨가군과 무첨가군 사이의 차이를 백분율 (%)로 나타내었다.

$$\text{Authentic ONOO}^- (\%) = \left(1 - \frac{Abs_{sample} - Abs_{blank}}{Abs_{negative\ control} - Abs_{blank}}\right) \times 100$$

*Abs<sub>sample</sub>* : 시료 첨가군의 흡광도 *Abs<sub>blank</sub>* : 시료 무첨가군의 흡광도  
*Abs<sub>negative control</sub>* : 0.3 N NaOH 처리군의 흡광도

통계처리

각각의 평가 분석은 3회 반복 이상으로 하였으며 시료로부터 얻어진 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석을 실시한 후 *P*<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 이때 사용한 모든 통계분석은 Statistic Analysis System (SAS Institute Inc, NC, USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다. 또한, 각 활성간의 상관관계는 각 활성의 EC<sub>50</sub> 값을 이용하여 Pearson correlation coefficient (*r* 또는 *r*<sup>2</sup>)로 계산해 나타냈다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량

국내산 *Semisulcospira* 속의 5종 다슬기에 대한 총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법에 의해 측정하였다. 이들의 총페놀 함량은 32.3-87.9 mg gallic acid equivalent (GAE)/g로 같은 속의 다슬기에 있어서도 종에 따라 넓은 범위에서 차이를 나타냈다 (Table 1). 즉, *S. forticosta*, *S. gottschei* 그리고 *S. coreana*는 다른 종들에 비해 높은 함량은 나타냈으며, *S. libertina*와 *S. tegulata*는 위의 종들에 비해 1/2 이하의 낮은 함량을 나타냈다. 이것은 종별 유의차 (*P*<0.05)를 바탕으로 본 결과에서도 알 수 있듯이 종별 유의차는 *P*<0.05에서 부분적

Table 1. Total phenolic contents (mg GAE/g) of 5 species of melania snails

| (Unit : mg GAE/g)    |                          |
|----------------------|--------------------------|
| Samples              | Total phenolic contents  |
| <i>S. coreana</i>    | 68.7 ± 12.6 <sup>b</sup> |
| <i>S. forticosta</i> | 87.9 ± 6.9 <sup>a</sup>  |
| <i>S. libertina</i>  | 32.3 ± 1.0 <sup>c</sup>  |
| <i>S. tegulata</i>   | 36.9 ± 0.5 <sup>c</sup>  |
| <i>S. gottschei</i>  | 77.7 ± 1.6 <sup>ab</sup> |

a-c Means with the different letters at the same concentration are significantly different (*P*<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD (n=3).

으로 인정되며, *S. libertina* 및 *S. tegulata*와 같이 아주 낮은 그룹과 기타의 그룹으로 나누어 질 수 있음을 알 수 있었다. 각종 생물에 존재하는 페놀성 화합물은 항산화 활성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 flavonoids, phenolic acids와 tannins과 같은 페놀성 화합물은 항산화제로써 뿐만이 아니고 면역, 항고혈압과 항암 활성과 같은 다양한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Chung et al., 1998).

Table 2. Antioxidant activities (EC<sub>50</sub> values) of 5 species of melania snails

| Samples                 | EC <sub>50</sub>         |                          |                                  |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
|                         | DPPH radical scavenging  | Reducing power           | Peroxynitrite radical scavenging |
| <i>S. coreana</i>       | 2.245±0.179 <sup>c</sup> | 0.052±0.014 <sup>c</sup> | 0.706±0.027 <sup>a</sup>         |
| <i>S. forticosta</i>    | 2.890±0.141 <sup>c</sup> | 0.066±0.002 <sup>c</sup> | 0.595±0.020 <sup>bc</sup>        |
| <i>S. libertina</i>     | 2.545±0.179 <sup>c</sup> | 0.882±0.033 <sup>a</sup> | 0.535±0.090 <sup>c</sup>         |
| <i>S. tegulata</i>      | 6.014±0.173 <sup>b</sup> | 0.580±0.211 <sup>b</sup> | 0.661±0.060 <sup>ab</sup>        |
| <i>S. gottschei</i>     | 9.319±1.276 <sup>a</sup> | 0.100±0.003 <sup>c</sup> | 0.672±0.002 <sup>ab</sup>        |
| Reference (gallic acid) | 0.006±0.0007             | 0.003±0.0001             | 0.004±0.0001                     |

a-c Means with the different letters at the EC<sub>50</sub> values are significantly different (*P*<0.05) by Duncan's multiple range test. The EC<sub>50</sub> values of each activities are expressed as mean SD (n=3).

DPPH radical 소거 활성

*Semisulcospira* 속의 5종 다슬기 추출물의 농도별 DPPH radical 소거 활성평가 결과를 바탕으로 하여 얻은 각 시료별 EC<sub>50</sub> 값 (Table 2)을 비교한 결과, *S. coreana*, *S. libertina* 및 *S. forticosta*는 각각 2.245±0.179 mg/mL, 2.545±0.179 mg/mL 및 2.890±0.141 mg/mL로 낮은 값을 나타낸 반면 *S. gottschei* 및 *S. tegulata*는 각각 9.319±1.276 mg/mL 및 6.014±0.173 mg/mL로 상대적으로 높은 값을 나타냈다. 이것은 대조군인 gallic acid가 나타내는 EC<sub>50</sub> 값이 0.006±0.001 mg/mL인 것에 비교하면 DPPH radical 소거활성이 상대적으로 아주 낮지만 종별로 DPPH radical 소거활성이 유의차 (*P*<0.05) 범위 내에서 종별 차이가 인정됨을 보여주고 있다. 각 시료의 농도별 DPPH radical 소거능은 Fig. 1에 나타냈으며 4 mg/mL의 농도에서 37.0-67.5%를 나타냈다. 이것은 EC<sub>50</sub>의 결과에서도 언급했듯이 종별 차이 (*P*<0.05)는 인정되지만 대조군인 gallic acid의 값보다는 상대적으로 낮음을 보여주고 있다. 그러나 이것은 전복의 80% 에탄올 추출물에 대한 18.43%였다는 Kim et al. (2006)의 보고에 비하면 다슬기 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능이 우수함을 알 수 있었다. Muramoto (1998)는 콩 펩타이드 중 histidine을 가지는 tripeptide 또는 tetrapeptide들이 금속이온 킬레이트 효과가 커서 항산화능을 갖는다고 하였고, Babizhayev et al. (1994)은 근육세포에 존재하는 dipeptide인 carnosine 또는 carbinine이 hydroxyl radical을 소거하며 이는

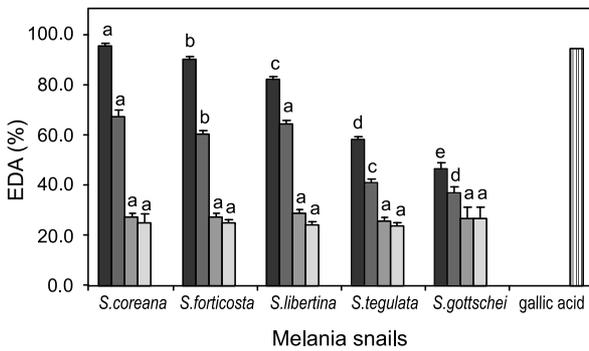


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of the melania snail extracts. 8 mg/mL (■), 4 mg/mL (■), 0.4 mg/mL (■) and 0.04 mg/mL (■) of the melania snail extracts and 0.04 mg/mL (▨) of the positive control (gallic acid) were used to determine the DPPH radical scavenging activity. a-e Means with the different letters at the same concentration are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD (n=3).

histidine의 금속이온 킬레이트 효과 때문이라고 보고하였다. 이것은 본 연구에서 사용한 5종의 다슬기 중 포함된 histidine 및 carnosine (Lim et al., 2009) 등이 DPPH radical 소거능과 깊이 관여할 수도 있음을 시사해 주고 있다. 그러나 다슬기의 DPPH radical 소거능이 histidine과 같은 아미노산 성분에 기인하는 것인지는 아직까지 명확하게 설명할 수가 없으며, 이후 또 다른 연구에서 증명되어야 할 것이다. 한편, Lee and Park (1999)은 DPPH에 대한 해조류 추출물의 항산화력을 평가한 결과 항산화 활성을 나타내는 성분은 어떠한 단일 성분이 아니라 여러 성분이 복합적으로 존재함으로써 상승효과 또는 보호효과가 나타나고, 총페놀함량과 비례적으로 증가하거나 감소하는 경향이 있다고 보고하였으며, 시료의 지리적 위치, 계절과 성장 조건, 성장 정도 등에 따라서 다를 수 있다고 보고하였다. 따라서, 이끼류, 조류 및 수중의 미세부유물질을 주로 섭취하는 다슬기 경우에도 먹이 중에 포함되어 있는 페놀성 항산화물질이 그 추출물 내에 함유되어 있을 수 있는 가능성을 제시해 준다.

SOD 유사활성

SOD 유사활성물질은 활성산소의 시발물질이라 할 수 있는 superoxide anion을 scavenging하여 생체에 실질적으로 상해를 유발하는 hydroxyl radical과 과산화수소의 생성을 억제하는 효능을 나타낸다. 생체 내에서 superoxide anion을 제거하는 물질로는 superoxide dismutase (SOD)라는 효소가 있지만 *in vitro*에서 재현하기 어려운 관계로 SOD와 작용기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사한 SOD 유사활성을 이용하여 superoxide radical 소거활성을 평가하고 있다. 지금까지 SOD 유사활성 물질의 탐색은 식물체 추출물 (Kim et al., 1994)과 carnosine 등과 같은 근육 추출물 (Lee et al., 2007)등에서 이루어져 그 효능이 평가된 바 있다. 본 연구에서 사용한 5종의 다슬기 메탄올 추출물의 경우, 5.88 mg/mL의 농도에서 *S. coreana* 와 *S. forticosta*는 모두 5% 이하의 낮은 SOD 유사활성

을 나타낸 반면 *S. libertina*, *S. tegulata* 및 *S. gottschei*는 34.7~65.5%로 상대적으로 높은 SOD 유사활성이 나타났으며, 그 가운데 *S. tegulata*의 활성이 65.5%로 가장 높았다 (Fig. 2). 이는 본 연구에서 사용한 *Semisulcospira* spp.의 5종 다슬기가 SOD 유사활성이 낮은 그룹 (*S. coreana* 와 *S. forticosta*)과 기타의 높은 그룹으로 분류됨을 나타내 준다. 한편, positive control인 L-ascorbic acid가 1 mg/mL의 농도에서 94.2%의 활성을 나타낸 것과 비교하면 다소 낮은 활성이지만 다슬기 추출물이 단일 분리물질이 아닌 메탄올 추출물임을 감안할 때, *S. tegulata*가 superoxide anion의 소거능 평가에 이용될 수 있는 적절한 시료임을 시사해 준다.

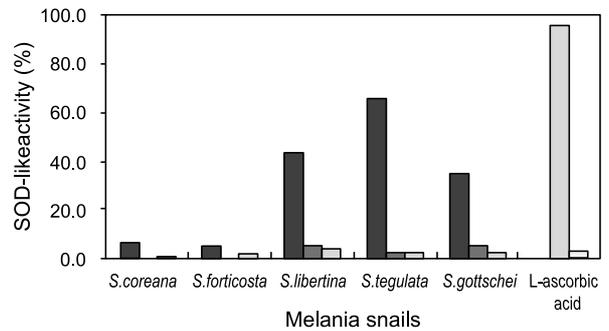


Fig. 2. SOD-like activities of the melania snail extracts. 5.88 mg/mL (■), 2.94 mg/mL (■) and 1.176 mg/mL (■) of the melania snail extracts and 1 mg/mL (■) and 0.1 mg/mL (□) of the positive control (L-ascorbic acid) were used to determine the SOD-like activity.

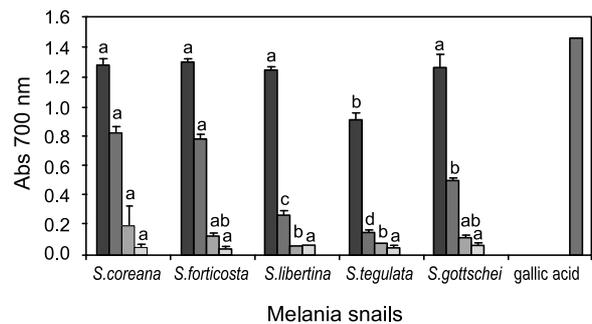


Fig. 3. Reducing power activities of the melania snail extracts. 1 mg/mL (■), 0.1 mg/mL (■), 0.01 mg/mL (■) and 0.001 mg/mL (□) of the melania snail extracts and 0.0733 mg/mL (■) of the positive control (gallic acid) were used to determine the reducing power activity. a-d Means with the different letters at the same concentration are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD (n=3).

Reducing power

5종 다슬기 메탄올 추출물의 reducing power를 알아보기 위해  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  변환률 측정하는 Oyaizu의 방법을 이용하였다. Reducing power는 항산화 활성을 나타내는 지표 중에 하나로

어떤 항산화제의 효능은 그들의 환원력과 깊이 관련되어 있다고 알려져 있다 (Jayaprakasha et al., 2001). 또한, Duh et al. (1999)은 항산화제의 환원력이 일반적으로 아스코르빈산과 같은 환원제와 관련 있다고 보고하였다. 이러한 환원제는 peroxide의 선구물질과 반응하고 peroxide 형성을 방해하며 (Xing et al., 2005), 수소전자공여에 의한 free radical chain breaking과 같은 항산화 반응에도 영향을 끼친다고 알려졌다 (Goldon and Hudson, 1990). 5종 다슬기 메탄올 추출물의 reducing power는 Fig. 3과 Table 2에 나타내었으며 시료 농도 1 mg/mL에서 *S. forticosta* (1.31±0.02), *S. coreana* (1.28±0.04), *S. gottschei* (1.26±0.01), *S. libertina* (1.25±0.01), *S. tegulata* (0.92±0.04)의 흡광도 (700 nm)를 나타냈으며 종별 차이는 크게 나타나지 않았다. 다만 0.1 mg/mL의 농도를 사용했을 경우 *S. coreana*와 *S. forticosta*에 비교하여 *S. libertina*와 *S. tegulata*의 환원력이 급격히 감소하였으며, 이는 reducing power의 EC<sub>50</sub> 값에 직접적인 영향을 끼쳐 *S. coreana*의 경우에 가장 낮은 0.052±0.014 mg/mL 그리고 *S. libertina*의 경우에 가장 높은 0.882±0.033 mg/mL의 EC<sub>50</sub> 값이 얻어져 실질적으로는 P<0.05에서 종별 유의차가 인정됨을 알 수 있었다 (Table 2).

Peroxynitrite anion 소거 활성

반응성이 매우 높은 강력한 산화제인 ONOO<sup>-</sup>는 다른 자유라디칼보다 비교적 안정적인 분자로 단백질과 지질의 과산화를 유발하고 DNA의 산화와 세포독성을 일으키거나 알츠하이머병, 류마티스 관절염, 암, 동맥경화, 당뇨병 등과 같은 만성 질환에 관여한다고 보고되어져 왔다 (Lin et al., 1997). 하지만 인체 내에는 ONOO<sup>-</sup> 소거에 관여하는 효소계가 존재하지 않으므로 ONOO<sup>-</sup>의 소거활성을 갖는 물질의 탐색은 큰 의의가 있다 (Choi et al., 2005). 현재까지 알려진 ONOO<sup>-</sup>의 소거제로는 penicillamine과 같은 합성 산화제와 flavonoid, phenol성 화합물과 같은 천연물 유래 성분 등이 보고되어져 있다 (Aruoma et al., 1997).

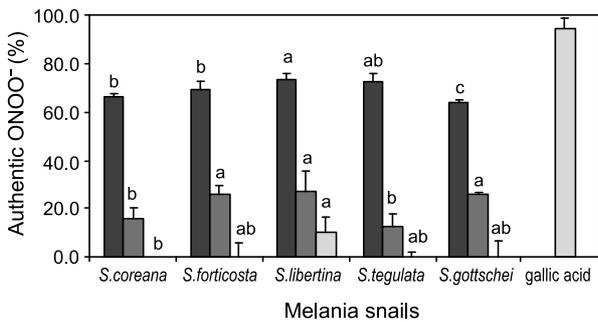


Fig. 4. Peroxynitrite anion scavenging activities of the melania snail extracts. 1 mg/mL (■), 0.1 mg/mL (▒) and 0.01 mg/mL (□) of the melania snail extracts and 0.04 mg/mL (□) of the positive control (gallic acid) were used to determine the peroxynitrite radical scavenging activity. a-c Means with the different letters at the same concentration are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD (n=3).

Fig. 4는 DHR 123이 산화되면서 방출하는 형광을 측정함으로써 얻어진 *Semisulcospira* spp 5종 다슬기 메탄올 추출물의 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성효과를 측정한 결과이다. 각 다슬기 메탄올 추출물 1 mg/mL의 농도에서 ONOO<sup>-</sup> 소거능은 64.1~71.1%를 나타냈으며, *S. gottschei*를 제외하고는 중간 소거활성의 차이는 크게 나타나지 않았다. 한편 0.1 mg/mL의 농도에서는 모든 시료에 의한 ONOO<sup>-</sup> 소거활성이 급격하게 저하하는 결과를 나타냈으며, 이는 ONOO<sup>-</sup> 소거능이 농도 의존적임을 시사하고 있으나 Table 2에서도 알 수 있듯이 종별 유의차는 인정되지 않았다. 한편, 양성대조군인 gallic acid의 최종 농도가 0.04 mg/mL일때 93.8%의 ONOO<sup>-</sup>가 소거되는 것에 비하면 5종 다슬기 추출물의 peroxynitrite anion 소거활성은 상대적으로 낮음을 알 수 있었다.

Table 3. Correlation coefficients (r or r<sup>2</sup>) of antioxidant activity values (mg GAE/g, EC<sub>50</sub>) of 5 species of melania snails

|   | TPC            | DPPH radical scavenging activity | reducing power | Peroxynitrite anion scavenging activity |
|---|----------------|----------------------------------|----------------|---|
| TPC                                     |                | 0.118 (0.014)                    | -0.930 (0.864) | 0.293 (0.086)                           |
| DPPH radical scavenging activity        | 0.118 (0.014)  |                                  | -0.164 (0.027) | 0.358 (0.128)                           |
| Reducing power                          | -0.930 (0.864) | -0.164 (0.027)                   |                | -0.615 (0.378)                          |
| Peroxynitrite anion scavenging activity | 0.293 (0.086)  | 0.358 (0.128)                    | -0.615 (0.378) |   |

The data in parentheses mean the correlation coefficients (r<sup>2</sup>).

총 페놀 함량, DPPH radical 소거능, Reducing power 및 Peroxynitrite anion 소거능 간의 상관성

*Semisulcospira* spp. 5종 다슬기 추출물의 총 페놀 함량과 각 항산화 활성간의 상관성을 EC<sub>50</sub> 값을 바탕으로 조사하여 상관계수 (r 또는 r<sup>2</sup>)로 나타내었다 (Table 3). 즉, 총 페놀 함량과 reducing power간의 상관계수 (r<sup>2</sup>)는 0.864로 다른 활성들간의 상관계수 보다 높게 나타나났으나 r (-0.930)값에서 보듯이 음의 상관관계를 나타냄으로서 페놀성 물질의 함량과 환원력을 갖는 물질간의 상관관계는 그다지 높지 않은 것을 알 수 있다. 또한 환원력과 peroxynitrite anion 소거능과의 상관계수 (r)도 -0.615으로 음으로의 상관관계 값을 나타냈다. 다만 총 페놀 함량과 peroxynitrite anion 소거능과의 상관계수 (r)는 0.293 그리고 DPPH radical 소거활성과 peroxynitrite anion 소거능과의 상관계수 (r)는 0.358인 점으로 미루어 서로의 상관관계는 다소 있지만 크게 영향을 미칠 정도의 영향력은 보이지 않음을 알 수 있었다. 이들 결과를 통해 다슬기의 항산화 활성은 페놀 함량 또는 환원력과는 상관관계가 적고 다른 요인에 의하여 활성이 나타나고 있음을 시사하고 있으며, 그 요인에 대하여는 추가적인 연구를 통하여 명백히 해 가야 할 것으로 판단된다. 한편, Statue-Gracia et al. (1997)과

Heinone et al. (1998)은 페놀함량에 기초하여 항산화 활성을 설명하기는 어렵고 시료의 특징적인 구조에 따라 설명되어진다고 보고하였으며, Velioglu et al. (1998)은 약용식물이나 안토시아닌이 풍부한 과일 등에서 있어서도 총 페놀 함량과 항산화 활성간의 상관성이 적을 수 있음을 보고한 바 있다.

## 사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원 수산물의 영양 및 건강기능성 연구 (RP-2010-BT-017)의 지원에 의해 수행되었습니다. 본 연구를 위하여 다슬기 5종의 시료를 제공해 주신 삼다리 수산영어조합법인에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Aruoma OI, Whiteman M, England TG and Halliwell B. 1997. Antioxidant action of ergothioneine: Assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Bioch Biophys Res Commun* 231, 389-391.
- Babizhayev MA, Sefuin MC, Gueyne J, Evstigneeva RP, Ageyeva EA and Zheltukhina GAL. 1994. Carosine and carcinine act as natural antioxidants with hydroxyl-radical scavenging and lipid peroxidase activities. *J Biochem* 304, 509-516.
- Blios MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26, 1158.
- Cheung LM, Cheung PCK and Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolic of edible mushroom extracts. *Food Chem* 81, 249-255.
- Choi JS, Chung HY, Kang HH, Jung MJ, Kim JW, No JK and Jung HJ. 2002. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytother Res* 16, 232-235.
- Chung KT, Wong TY and Wei CI. 1998. Tannins and human health: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38, 421-464.
- Duh PD, Tu YY and Yen GC. 1999. Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm-Wiss u-Technol* 32, 269-277.
- Finkel T and Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 405, 903-904.
- Goldon MH and Hudson B. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: *Food antioxidants*. Hudson B, ed. Elsevier Applied Science, London, England, 1-18.
- Heinone M, Lehtonen PJ and Hopia A. 1998. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. *J Agric Food Chem* 46, 25-31.
- Jayaprakasha GK, Singh RP and Sakariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem* 73, 285-290.
- Kee HJ and Park YK. 1999. Effect of seaweeds and absorbents on volatile flavor components of onion juice. *Kor J Food Sci Technol* 31, 1477-1483.
- Kim HL, Kang SG, Kim IC, Kim SJ, Kim DW, Ma SJ, Gao T, Li H, Kim MJ, Lee TH and Ham KS. 2006. *In vitro* anti-hypertensive, antioxidant and anticoagulant activities of extracts from *Haliothis discus hannai*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35, 835-840.
- Kim IH. 1999. An excellent means and principles of medical herbs. In: *Naturopathic medicine medical herbs*. Kim YS, ed. Insandongcheon, Hamyang, Korea, 29.
- Kim SJ, Han DS, Park MH and RHee JS. 1994. Screening for superoxide dismutase-like compounds and its activators in extracts of fruits and vegetables. *Biosci Biotech Biochem* 58, 2263-2265.
- Kim YH, Lee TK and Cha YS. 1985. Studies on the nutritive component of black snail (*Semisulcospira libertina*). *Bull Agric College Chonbuk Univ* 16, 101-105.
- Kim YK, Moon HS, Lee MH, Park MJ, Lim CW, Park JI, Yoon HD and Kim DH. 2009. Biological activities of seven melania snails in Korea. *Kor J Fish Aquat Sci* 42, 434-441.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H and Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediate oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free radical Bio Med* 16, 146-156.
- Lee KT, Song HS and Park SM. 2007. Antioxidant effects of carnosine extracted from the eel *Anguilla japonica*. *J Kor Fish Soc* 40, 193-200.
- Lim CW, Kim YK, Kim DH, Park JI, Lee MH, Park HY and Jang MS. 2009. Comparison of quality characteristics of melania snails in Korea. *Kor J Fish Aquat Sci* 42, 411-416.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem* 102, 771-776.
- Lin KT, Xue JY, Sun FF and Wong PF. 1997. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 115-119.
- Marklund S and Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide

- dismutase. *Eur J Biochem* 47, 468-474.
- Muramoto K. 1998. Functional properties of proteolytic hydrolysates of soybean proteins: Antioxidative activity against the peroxidation of linoleic acid and inhibitory activity on the crystallization of calcium chloride. In: *Proceeding of the 30th KSFOST Annual International Symposium on Soybean Peptides and Human Health*. Seoul University, Seoul, Korea, 115-123.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44, 307-315.
- Ryu CK and Hwang MK. 1990. Immune suppression and stimulation of antioxidants 2-effect of propyl gallate on murine cell mediated immune functions. *Korean J Food Hygiene* 5, 41-48.
- Statue-Gracia MT, Heionen M and Frankel EN. 1997. Antioxidant activity of anthocyanin in LDL and lecithin liposome system. *J Agric Food Chem* 5, 3362-3367
- Xing R, Lui S, Guo Z, Wang P and Li C. 2005. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorg Med Chem* 13, 1573-1577.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L and Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46, 4113-4117.

---

2010년 5월 7일 접수

2010년 5월 19일 수정

2010년 6월 15일 수리