

## 군소내장 분획물의 항산화 및 항균효과

신 미 옥

신라대학교 식품영양학과

### The Antioxidative and Antimicrobial Effects of Internal Organs of *Aplysia kurodai* Fractions

Mi-Ok Shin

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

#### Abstract

This study was carried out to investigate the antioxidative and antimicrobial activities of internal organs of *Aplysia kurodai* (AK). The internal organs of AK were extracted with methanol (AKM), which was then further fractionated into four subfractions by using solvent partition method, affording hexane (AKMH), methanol (AKMM), butanol (AKMB), and aqueous (AKMA) soluble fractions. The antioxidative activity of fractions from AK was investigated by measuring the scavenging activities of AK against DPPH radical, peroxyntirite (ONOO<sup>-</sup>) and reactive oxygen species (ROS). Among the various solvent fractions, AKMB showed a marked scavenging effect against DPPH radical, peroxyntirite (ONOO<sup>-</sup>) and reactive oxygen species (ROS). The antimicrobial activity was increased in proportion to its concentration by the paper disk method. Among the various solvent fractions, AKMM fractions of AK showed the strongest antimicrobial activities. The methanol extracts exhibited antimicrobial activity against all organisms tested, while the hexane extracts showed antimicrobial activity only against *Proteus vulgaris*. The results suggest that the AK may be suitable for development as a food preservative and alternative antioxidant.

**Key words:** antioxidative activity, antimicrobial activity, internal organs of *Aplysia kurodai* (AK)

#### 서 론

Superoxide radical anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(OH·) 등과 같은 반응성이 큰 reactive oxygen species(ROS)와 nitric oxide(NO·), peroxyntirite (ONOO<sup>-</sup>)와 같은 reactive nitrogen species(RNS)는 생체 내에서의 산화와 관련된 현상으로 인식되고 있는 노화의 원인 물질로 알려져 있으며, 신진대사의 부산물질로서 세포내에서 계속적으로 생산되거나 환경으로부터 유입되어진다(1). 이와 같이 ROS와 RNS의 축적이 계속되면 세포내의 환경조건이 변화하게 됨으로써 지질과산화 유도, 단백질의 산화 및 DNA 변성 등을 유발시켜 세포의 정상적인 기능을 억제시키고, 세포의 노화와 관련된 여러 가지 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(2-4). 그러나 생체 내에는 복잡한 항산화 방어망이 잘 발달되어 있어 이들에 대항하여 보호 작용을 하는 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화 효소와 함께 vitamin E, vitamin C 및 glutathione 등과 같은 저분자 항산화 물질이 존재하여 인체를 유해한 산소로부터 보호해 주는 역할을 한다(5,6). 항산화물질은 식품산업,

의약품산업, 화장품산업 등 다양한 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업측면에서 매우 큰 파급 효과를 기대할 수 있다(7). 그러나 지금까지 알려진 항산화제가 약한 활성, 독성 및 사용상의 한계로 인하여 의약품활성물질로 사용하는 데 있어서 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 천연으로부터 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 천연 항산화제의 개발이 요구된다. 또한 소비자들의 식품첨가물에 대한 관심도가 높아짐에 따라 합성 보존제의 안전성 문제로 인한 기피현상이 나타나고 있으므로 인체에 무해한 천연물 유래의 항균제 개발 또한 절실히 요구되고 있다. 천연항균물질 중에는 전통적으로 사용해 온 소금, 식초 등 일반식품 소재 외에도 동물, 식물, 미생물 등에서 유래한 천연물질이 많이 보고되고 있다. 현재 상품화되어 있거나 항균성이 알려진 천연물질로는 주로 lysozyme, polylysine, protamine, conalbumin, avidin, 유기산, polyphenol 물질 등이 대표적이다(8,9). 한편, 최근에는 천연소재로서 해양생물에 대한 관심이 증대되어지고 있다. 해양생물은 육상생물과 다르게 내압, 내염 및 저온이라는 특수한 환경에서 서식하기 때문에 물리적 방어능력이 부족한 해양생물들이 적자생존의 경쟁 속에서 살아남기 위하여

만들어내는 2차 대사산물이 육상생물과는 상이한 화학적 특성을 갖고 있는 경우가 많아 천연자원에서 의약품 등의 생리활성물질을 탐색하여 개발하고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다(10). 본 연구에 사용되어진 군소(*Aplysia kurodai*)는 무순목 군소과에 속하는 연체동물로, 우리나라와 일본, 대만 등지의 조간대 얇은 바다에서 주로 서식하고 있으며, 홍조류, 갈조류 및 녹조류 등을 먹이로 하며 이들 해조류가 무성한 바위근처에서 주로 볼 수 있다(11). 흑갈색에 회백색 얼룩무늬가 많으며 몸을 보호하는 패각 대신 균청색 색소를 뽑아 자신을 보호하는 특징을 가지며, 일반적으로 조리 시 내장과 보라색 색소를 빼내고 삶아 군소몸통을 먹으며, 경상도 해안지방에서는 제사상에도 올려진다. 그리고 군소 체중의 약 50%나 되는 생식기관을 포함한 내장부분은 거의 대부분 폐기되어진다. 한편, 군소는 단순한 신경계와 동정이 쉬운 거대 뉴런을 지니고 있어 신경생물학 연구에 중요한 실험동물로 이용되고 있고, 미국에서는 군소의 신경계를 이용하여 학습과 기억에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다(12). 국내에서도 세계적 추세에 따라 군소의 신경 생물학적 연구가 절실히 요구되고 있으나 현재까지의 군소에 대한 연구는 아주 미비하며 단순히 분류나 분포 등에 관한 생태학적 보고가 되고 있을 뿐이다(11,13,14). 특히, 우리나라 연근해에 서식하는 군소는 식용 이외에는 거의 이용이 없는 실정이며, 군소에 대한 생물학적 기초 연구는 표지(tagging)를 이용한 조간대 군소의 성장에 대한 연구(15), 개체크기와 난의 크기와의 관계에 대한 연구(16) 등과 군소의 중추신경계를 이용한 SCPs, Buccalin, myomodulin 등의 신경성 펩타이드에 대한 연구(17-19) 등에 불과하다. 또한 폐기되어지는 해양생물 내장성분의 활성에 대한 연구로는 오징어 내장을 제외하고는 거의 없는 실정이다. 오징어 내장은 지방, 비타민 B군, 무기질 함량이 높고, 함황 아미노산의 일종인 타우린이 많아 지방의 흡수촉진, 콜레스테롤 및 중성지방 농도 저하, 뇌 발달, 심장 보호 작용, 삼투압조절, 생식기능, 성장 발달, 간기능 보호 및 산화성 독성제거 등과 같은 매우 다양한 기능을 가지고 있다고 보고되어지고 있다(20). 그리고 오징어 내장유의 정제와 오징어된장의 품질특성(21,22) 등이 보고되어져 있고, 또한 내장과 함께 제거되어지는 오징어먹물을 첨가한 식품(23,24)들도 활용 보고되어지고 있다.

본 연구에서는 폐기되어지는 군소 부산물인 군소 내장을 이용하여 항산화 및 항균효과를 검색함으로써 군소분획물의 식품 보존제 및 천연 항균제 등의 기능성 소재로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 군소내장(internal organs of *Aplysia kurodai*, AK)은 2008년 3월 부산 해운대 연안에서 구입하였

다. 실험에 사용된 시약중 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFDA), penicillamine, trolox 및 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 등의 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, dihydrorhodamine 123 (DHR123)은 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)로부터, ONOO<sup>-</sup>는 Cayman Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였으며, 추출용매 및 그 외 시약은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

### 시료의 추출 및 분획물 제조

시료로 사용된 군소내장은 수세, 건조하여 분쇄한 후 메탄올을 1:5(W/V)의 비율로 첨가하여 48시간 동안 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성으로 선별물질을 추출하기 위하여 다시 메탄올과 다이클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)을 1:1로 섞은 용액에 2회 추출한 후 회전식 진공농축기로 일정시간 감압농축시켜 동결건조한 후 군소내장 methanol 추출물(AKM)을 얻었다. 이 추출물을 hexane층(AKMH), methanol층(AKMM), butanol층(AKMB) 및 aqueous층(AKMA)으로 나누어 분획하고 각 분획층을 감압농축 후 동결건조 하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다.

### 항산화효과

**DPPH 라디칼 소거활성 측정:** 군소내장 분획물의 전자공여능(electron donating ability, EDA) 측정은 Blois의 방법(25)에 준하여 각 분획층의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정농도의 시료와 대조군으로 vitamin C를 사용하여 96-well plate에 160  $\mu$ L를 넣고 0.2 mM DPPH 40  $\mu$ L를 첨가하여 vortex로 균일하게 혼합한 다음 실온의 암실에서 30분간 방치한 후, Multi-detection microplate로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 측정할 때 웰에 분주되는 각 시료에 의한 흡광도의 차이는 ethanol만의 흡광도를 측정하여 보정해 주었고, 이때 전자공여능은 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율(%)로 구하였으며, 추출물의 EDA(%)값을 50% 감소시키는 IC<sub>50</sub>(inhibition concentration)을 구하였고 모든 실험은 3회 반복 측정하였다.

**ROS 제거능 측정:** ROS 제거능을 측정하기 위해 DCFDA 측정방법(26)을 사용하여 측정하였다. 99.9%의 ethanol에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/mL esterase를 -20°C에 stock solution으로 저장하고, 실험 시 10  $\mu$ L DCFDA와 600 U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(DCFH) 용액을 37°C에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관 하였다. 지용성의 DCFDA는 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화 되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 multi-detection microplate

reader로 측정하였다. 시료를 10 µL를 넣은 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 190 µL씩 넣고 반응시키고, DCFDA에 esterase를 넣어 만든 DCFH를 50 µL 첨가하여 25분간 생성된 형광의 변화를 관찰하였고 모든 실험은 3회 반복 측정하였다.

**ONOO<sup>-</sup> 제거능 측정:** Crow의 방법(27)에 의해 ONOO<sup>-</sup> 제거능을 측정하였다. 96-well plate에 sample을 농도별로 취하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 µM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 µM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 µM ONOO<sup>-</sup> 첨가한 후 형광광도를 이용하여 excitation(500 nm)과 emission(536 nm)을 측정하였고 모든 실험은 3회 반복 측정하였다.

**항균활성 측정**

**사용균주 및 배지:** 본 실험에 사용한 균주는 단백질 부패 원인균인 *Proteus vulgaris*(ATCC 6380), *Serratia marcescens* (ATCC 14756) 및 *Bacillus subtilis*(ATCC 6633)와 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), 병원균인 *Rhodococcus equi*(ATCC 6939) 5가지 균주를 사용하였으며, 각 균의 생육 및 보존을 위한 배지로는 각각 nutrient agar(Difco, Detroit, MI, USA), yeast extract 및 malt extract를 사용하였다.

**추출물의 용매 분획별 항균성 검색:** 분획된 균소내장 추출물의 항균력 검색은 paper disc method를 사용하였다(28). 항균성 시험용 평판배지는 멸균 후 petri dish에 20 mL씩 분주하여 응고시키고 전배양한 각종 시험균을 무균적으로 첨가하여 기층용 배지 위에 다시 10 mL씩 분주하여 이중의 평판배지를 만들었다. 각 용매 분획별 추출물의 농도를 500 ~2000 µg/mL로 하여 멸균된 disc(직경 6 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)에 흡수, 건조시켜 균주가 도말된 plate 표면에 올려놓은 후 37°C incubator에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로부터 각 분획물의 항균활성을 측정하였으며 실험을 5회 반복하여 평균치를 나타내었다.

**통계처리**

본 실험에 대한 실험결과는 3번 반복 실험하여 얻어진 평균치 및 표준편차를 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**균소내장의 각 용매별 분획물 수율**

균소내장은 동결건조 후 메탄올을 1:5(W/V)의 비율로 첨가한 후 48시간 동안 상온에서 2회 추출하고, 극성과 비극성으로 선별물질을 추출하기 위하여 다시 메탄올과 다이클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl)을 1:1로 섞은 용매에 2회 추출하여 균소내장 추출물(AKM) 23.62 g을 얻고, 이 추출물을 분획하여 hexane층(AKMH) 1.44%, methanol층(AKMM) 4.36%, butanol

**Table 1. Yields (%) of various solvent fractions of internal organs of *Aplysia kurodai* (AK)**

Fractions	Yields (g)	Yields (%)
Methanol ex.	23.62	23.62
Hexane fr.	0.34	1.44
Methanol fr.	1.03	4.36
n-Butanol fr.	0.68	2.88
Aqueous fr.	11.07	46.87

ex: extract, fr: fraction.

층(AKMB) 2.88% 및 aqueous층(AKMA) 46.87%를 수득하였으며, 각 시료의 용매별 수득율은 Table 1과 같다.

**DPPH free radical 소거활성**

DPPH free radical 소거활성법은 항산화활성을 측정하는 아주 간단한 방법으로 많은 연구자들이 이 방법을 이용하여 항산화활성을 측정하고 있다. DPPH는 hydrazyl의 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로써 자체의 정색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있게 된다. 일종의 전자공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원 정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가늠하게 된다(6). DPPH free radical 소거활성법을 통하여 활성산소의 인체 내 독성작용을 저지하는 활성물질 분리는 항산화제가 될 가능성이 있다. 균소내장의 각 용매별로 DPPH free radical 소거활성을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 여러 분획물 중 AKMB층에서 가장 높은 DPPH free radical 소거활성을 나타내었고 다른 분획층에서는 DPPH free radical의 소거활성이 아주 낮게 나타났다. 즉 AKMB층은 268.66 µg/mL에서 50%의 DPPH free radical의 소거활성을 보였으며, positive control인 ascorbic acid와 비교하였을 때 비교적 낮은 소거활성을 나타내었지만, 다른 분획층에 비해서는 두 배 이상의 높은 DPPH free radical 소거활성에 해당된다. 따라서 균소내장에 함유되어 있는 항산화물질이 부탄올에 잘 용해되는 물질로 추정되어진다. 해양생물에 대한 항산화에 대한 연구결과는 매우 드문데 이러한 결과는 해양생물인 아귀(29)추출물이 아세톤 분획물에서 가장 높은 DPPH 소거활성을 보인 결과와 서실(30)과 참가사리(31) 등의 해조류와 염생식물(32)들이 메탄올 분획물에서 가장 높은 DPPH 소거활성을 보인 결과와 다른 결과이며, 대부분의 식용 또는 약용식물들이 부탄

**Table 2. DPPH radical-scavenging activity of the partition layers of AK** (µg/mL)

Sample	IC <sub>50</sub> ±SE <sup>1)</sup>
AKMM	401.23±2.23
AKMH	568.15±3.31
AKMB	268.66±4.81*
AKMA	501.23±3.56
Ascorbic acid (control)	4.18±2.16

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: half-maximal scavenging concentration, SE: standard error, statistical significance: \*p<0.05 versus control.

Table 3. ROS scavenging activity of the partition layers of AK ( $\mu\text{g/mL}$ )

Sample	IC <sub>50</sub> ± SE <sup>1)</sup>
AKMM	120.56 ± 3.22
AKMH	156.43 ± 1.22
AKMB	54.73 ± 0.08*
AKMA	300.52 ± 4.28
Trolox (control)	5.42 ± 0.06

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: half-maximal scavenging concentration, SE: standard error, statistical significance: \*p<0.05 versus control.

을 분획층에서 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 나타낸 결과들과 유사하였다(33,34).

### ROS 제거능

Superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 hydroxyl radical(OH<sup>·</sup>) 등의 O<sub>2</sub> 대사물을 통칭하는 ROS는 생체 내에서 지속적으로 생성되지만 적절하게 제어되지 않으면 축적되어서 단백질, 지질, 핵산 등에 손상을 야기하고(35,36), 노화과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 군소내장 분획물의 ROS 제거활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 부탄올 분획층인 AKMB층은 54.73  $\mu\text{g/mL}$ 에서 50%의 ROS 제거활성을 나타내었다. Control인 trolox의 IC<sub>50</sub>농도인 5.42  $\mu\text{g/mL}$ 에 비교해보면 낮은 소거활성에 해당되지만, AKMM, AKMH 및 AKMA층과 비교하면 높은 제거활성에 해당된다. 다른 분획층에서는 모두 유의성 있는 ROS 제거활성을 볼 수 없었다. 이러한 결과는 해양생물인 말뚝성게(37) 추출물이 핵산 분획물에서 가장 높은 ROS 제거활성을 보인 결과와 다른 결과이며 또한 서실(30)과 참가사리(31) 등의 해조류가 메탄올 분획물에 가장 높은 ROS 제거활성을 보인 결과와도 달랐으며, 노박덩굴(38) 분획물이 부탄올 분획층에서 가장 높은 ROS 제거활성을 보인 결과와 유사했다.

### ONOO<sup>-</sup> 제거능

Nitric oxide(NO)는 세포막내에 쉽게 확산되며 다른 활성 산소들과 반응할 수 있는데, 특히 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)과 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrate(ONOO<sup>-</sup>)를 생성한다. ONOO<sup>-</sup>는 NO와 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 단백질, 지질 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡억제, 세포막 펌프억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이러한 ONOO<sup>-</sup>의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 당뇨병, 심근장해, 패혈증, 고혈압, 피

Table 4. ONOO<sup>-</sup> scavenging activity of the partition layers of AK ( $\mu\text{g/mL}$ )

Sample	IC <sub>50</sub> ± SE <sup>1)</sup>
AKMM	321.65 ± 0.12
AKMH	212.75 ± 3.66
AKMB	65.64 ± 0.11*
AKMA	765.64 ± 1.23
Penicillamine (control)	7.51 ± 0.03

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: half-maximal scavenging concentration, SE: standard error, statistical significance: \*p<0.05 versus control.

부염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다(39-41). 이러한 ONOO<sup>-</sup>를 제거하는 scavenger로 selenium을 포함하는 D-(-)-penicillamine과 ebselen 등이 알려져 있다. 인체 내에는 ONOO<sup>-</sup>를 불활성화시킬 수 있는 제거 효소가 밝혀져 있지 않으므로 ONOO<sup>-</sup> 제거활성 물질을 탐색하는 것은 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 큰 의미가 있다고 할 수 있다. 군소내장 용매 분획물의 ONOO<sup>-</sup> 소거활성을 DHR 123을 이용하여 측정된 결과는 Table 4와 같다. 군소내장 분획물의 ONOO<sup>-</sup>의 제거활성은 앞서의 DPPH free radical 소거활성과 ROS 제거능과 마찬가지로 AKMB층에서 가장 높은 제거활성을 나타내었고 다른 분획층에서는 유의성 있는 ONOO<sup>-</sup>의 제거활성을 볼 수 없었다. Positive control인 penicillamine의 IC<sub>50</sub>값 7.51  $\mu\text{g/mL}$ 과 비교하였을 때 AKMB층은 65.64  $\mu\text{g/mL}$ 에서 50%의 ONOO<sup>-</sup>의 제거활성을 보였으며 다른 분획층에서는 모두 100  $\mu\text{g/mL}$  이상의 높은 농도에서 제거활성을 나타내었다. 이상으로 DPPH free radical, ROS 및 ONOO<sup>-</sup> 제거활성 모두 부탄올 분획층인 AKMB층에서 가장 높게 나타났으므로 AKMB층에의 항산화 활성 효과를 알 수 있었으며, 항산화 활성을 나타내는 유효한 생리활성물질이 특히, AKMB층에 함유되어 있을 가능성이 추정되어지며 앞으로 더욱 심도 있는 연구를 통해 활성물질들을 규명하고 구조와 그 기전들을 알아보는 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

### 항균활성 측정

군소내장 분획물의 항균활성은 전반적으로 disc에 점적한 분획물의 농도가 증가할수록 농도 의존적인 항균활성을 나타내었으며 그 결과는 Table 5와 같다. *Proteus vulgaris*의 경우 AKMM층과 AKMH층에서 농도 의존적으로 항균활성이 나타났으며, AKMB층과 AKMA층에서는 항균활성을 볼 수 없었다. AKMH층의 경우 군소내장 분획물을 각각 500, 1000, 1500 및 2000  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때 각각 7.3, 8.3, 9.3 및 10.0 mm의 clear zone의 크기를 나타내어 AKMM층의 clear zone의 크기인 6.6, 7.3, 8.6 및 8.6 mm에 비교해서 보다 더 높은 항균활성을 나타내었다. *Serratia marcescens*의 경우 AKMM 층에서만 항균활성이 나타남을 알 수 있었다. 군소내장 분획물의 500, 1000, 1500 및 2000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 7.5, 8.6, 9.5 및 9.6 mm의 clear zone이 측정되었다. *Bacillus subtilis*의 경우에서도 앞서의

Table 5. Antimicrobial activity of the partition layers of AK

Stains	Fractions µg/mL	Clear zone on plate (mm) <sup>1)</sup>			
		AKMM	AKMH	AKMB	AKMA
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 6380)	500	+	++	-	-
	1000	++	++	-	-
	1500	+++	+++	-	-
	2000	+++	++++	-	-
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 14756)	500	++	-	-	-
	1000	+++	-	-	-
	1500	+++	-	-	-
	2000	+++	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	500	++	-	-	-
	1000	++	-	-	-
	1500	+++	-	-	-
	2000	+++	++	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	500	-	-	-	-
	1000	++	-	-	-
	1500	++	-	-	-
	2000	++	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> (ATCC 6939)	500	++	-	-	-
	1000	++	-	-	-
	1500	+++	-	-	-
	2000	++++	-	-	-

<sup>1)</sup>AKMM: methanol partition layer of methanol extracts of *Aplysia kurodai* (AKM), AKMH: hexane partition layer of AKM, AKMB: butanol partition layer of AKM, AKMA: aqueous layer of AKM.

<sup>2)</sup>Treated sample was adsorbed into paper disc (6 mm, diameter) and the diameter (mm) of clear zone was confirmed around the colony.

Growth inhibition size of clear zone: +++++, larger than 10.0 mm; +++, 10.0~8.5 mm; ++, 8.5~7.0 mm; +, smaller than 7.0 mm; -, not detected.

*Serratia marcescens*의 경우와 같이 AKMM층에서 가장 높은 항균활성이 나타났으며, 500 µg/mL의 농도 처리 시 7.3 mm의 항균활성을 나타내었고, 그 값이 농도 의존적으로 점차 증가하다 최종 농도인 2000 µg/mL에서 9.3의 높은 항균활성을 볼 수 있었다. 그리고 AKMH층에서는 500, 100 및 1500 µg/mL에서 항균활성이 거의 나타나지 않았으나 최종 농도인 2000 µg/mL 농도에서만 7.0 mm의 clear zone이 측정되어 낮은 항균활성 효과를 볼 수 있었다. 그러나 AKMB층과 AKMA층에서는 항균활성 효과를 전혀 볼 수 없었다. *Staphylococcus aureus*의 경우에서도 *Bacillus subtilis*와 *Serratia marcescens*에서와 같이 AKMM층에서만 항균활성을 보였으며, AKMM층의 경우는 최저 농도인 500 µg/mL에서 6.7 mm의 항균활성을 보였고 1000, 1500 및 2000 µg/mL 농도에서는 각각 7.5, 8.4 및 8.4 mm의 항균활성을 나타내었다. 그러나 다른 모든 분획층인 AKMA, AKMB 및 AKMH층에서는 전혀 항균활성이 나타나지 않았다. *Rhodococcus equi*의 경우에서도 AKMM층에서만 항균활성을 보였으며, AKMM층의 경우는 최저 농도인 500 µg/mL에서 7.2 mm의 항균활성을 보였고 1000, 1500 및 2000 µg/mL 농도에서는 각각 7.6, 9.3 및 10.6 mm의 항균활성을 나타내었으며 실험

에 사용한 균주 중에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과에서 균소내장 분획물의 주요 항균활성 물질은 극성용매인 메탄올 층에서 주로 잘 녹는 물질로 추정되어진다. 그리고 해양생물의 경우는 항균효과에 대한 연구결과가 거의 드문 실정이므로 특히, 메탄올층에서 항균활성을 보인 균소내장 분획물의 항균활성 성분이 기대되어진다.

### 요 약

본 연구는 해양생물 중 폐기되어지던 균소내장을 추출하고 각 용매별로 분획하여 항산화 효과 및 항균활성을 측정하였다. DPPH free radical 소거활성을 측정하여 항산화 활성효과를 알아 본 결과 AKMB층이 286.66 µg/mL에서 50%의 DPPH free radical의 소거활성을 보여 가장 높은 항산화효과를 나타내었다. ROS 제거활성 측정 결과에서도 AKMB층이 가장 높은 항산화 효과를 나타내었으며 54.73 µg/mL에서 50%의 ROS 제거 활성을 나타내었고, ONOO<sup>-</sup> 제거활성 역시 AKMB층이 가장 높게 나타났으며, 65.64 µg/mL에서 50%의 ONOO<sup>-</sup> 제거활성을 나타냈다. 또한 paper disc method를 이용한 항균효과 실험결과, *Proteus vulgaris*의 경우는 AKMH층과 AKMM층의 두층에서 높은 항균활성을 나타내었고, 그 외 사용한 모든 균주에서는 AKMM층에서 가장 높은 항균활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이상의 결과로 항산화효과는 균소내장의 부탄올 분획층인 AKMB층에서 가장 높았으며, 항균효과는 주로 메탄올 분획층인 AKMM층에서 높은 항균활성을 나타내었다. 따라서 균소내장의 AKMB층과 AKMM층에서 항산화 활성과 항균력을 나타내는 효과적인 생리활성물질이 함유되어 있을 것으로 사료되어지며, 앞으로 더욱 심도 있는 연구를 통하여 이러한 물질들의 분리를 위한 연구가 더 필요한 것으로 판단되며 이러한 활성성분을 이용한 식품 저장성과 안전성 향상을 위한 항산화제, 식품첨가제 및 천연 식품 보존제 등의 개발 가능성이 기대되어진다.

### 문 헌

1. Stratton SP, Liebler DC. 1997. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochemistry* 36: 12911-12920.
2. Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32: 71-110.
3. Schneider JE, Price S, Maitt L, Gutteridge JM, Floyd RA. 1990. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res* 18: 631-635.
4. Wright A, Bubb WA, Hawkins CL, Davies MJ. 2002. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues.

- Photochem Photobiol* 76: 35-46.
5. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. 1987. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924: 408-419.
  6. Yu HE, Leaniza MM, Bae YJ, Lee DH, Park JS, Kwak HS, Kim HK, Lee JS. 2005. Screening and extraction condition of antiaging bioactive substances from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1136-1142.
  7. Namiki M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29: 273-300.
  8. Cho MH, Bae EK, Ha SD, Park JY. 2005. Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Sci Ins* 38: 36-45.
  9. Lee JH, Lee SR. 1994. Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. *Korean J Food Sci Technol* 26: 317-323.
  10. Park JC, Choi JW. 1996. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Kor J Pharmacogn* 27: 117-122.
  11. Choe BL, Lee JR. 1994. Opisthobranchs (mollusca: gastropoda) from Ullung and Dog-do islands, Korea. *Korean J Zool* 37: 352-376.
  12. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. *Principles of neural science*. 4th ed. Mc Graw-Hill, New York, USA. p 180.
  13. Kim HS, Choe BL. 1981. The fauna of marine invertebrate in Ulreung is and Dog-do is, special report. *The Conservation of Nature and Natural Resources* 19: 193-200.
  14. Lee JS, Min DK. 2002. A catalogue of molluscan fauna in Korea. *Opisthobranchs* 18: 93-97.
  15. Nishiwaki S, Ueda H, Makioka T. 1975. Tagging studies on the growth of the sea hare *Aplysia kurodai* on an intertidal rocky shore. *Marine Biology* 32: 389-395.
  16. Tusa Y. 1994. Size-related egg production in a simultaneous hermaphrodite, the sea hare *Aplysia kurodai* baba (mollusca: opisthobranchia). *Publ Seto Mar Biol* 36: 249-254.
  17. Kim CH, Seo HJ, Hwang EY, Kim EJ, Go HJ, Kim IH, Seo JK, Moon JH, Huh MD, Park NG. 2001. Purification of myomodulin A and myomodulin E from the central nervous system of the sea hare, *Aplysia kurodai*. *J Korean Fish Soc* 34: 279-284.
  18. Lloyd PE, Kufermann I, Weiss KR. 1987. Sequence of small cardioactive peptide A: A second member of a class of neuropeptides in *Aplysia*. *Peptides* 8: 179-184.
  19. Morris HR, Panico M, Karplus A, Lloyd PE, Riniker B. 1982. Elucidation by FAB-MS of the structure of a new cardioactive peptide from *Aplysia*. *Nature* 300: 643-645.
  20. Seo JH, Jeong YJ, Lee GD, Lee MH. 1999. Monitoring characteristics of protease isolated from squid viscera. *J East Asian Soc Dietary Lié* 9: 195-199.
  21. Kim JH, Ha JH, Lee EH. 1997. Refining of squid viscera oil. *J Kor Soc Appl Biol Chem* 40: 294-300.
  22. Jeong YJ, Seo JH. 2001. Quality characteristics for doenjang using squid internal organs. *Korean J Food Sci Technol* 33: 89-93.
  23. Oh SC, Cho JS. 2002. The change of non-volatile organic acids in low salt fermented squid affected by adding to squid ink. *J Korean Oil Chem Soc* 20: 64-71.
  24. Shim JH, Kim KM, Bae DH. 2003. Comparisons of physicochemical and sensory properties in noodles containing spinach juice, beetroot juice and cuttlefish ink. *Food Eng Prog* 7: 37-43.
  25. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  26. Paraiathathu T, Kegerer JP. 1992. Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radic Biol Med* 13: 289-297.
  27. Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydro-rhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145-157.
  28. Davidson PM, Parish ME. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *J Food Sci Technol* 1: 148-155.
  29. Lee SH, Shin JH, Koo MO, Jung ES, Jeon GI, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2007. Antigenotoxic activities of extracts from anglerfish. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1229-1234.
  30. Bae SJ. 2004. Studies on the antioxidative and antimicrobial effects of *Chondria crassicaulis*. *J Lié Sci* 14: 411-416.
  31. Jung YH, Jung BM, Kang DY, Ku MJ, Shin MO, Bae SJ. 2006. The antioxidative and antimicrobial effects of *Gloio-peltis tenax*. *Korean J Nutr* 39: 366-371.
  32. Lee HJ, Kim YA, Ahn JW, Lee BJ, Moon SG, Seo YW. 2004. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants. *Korean J Biotechnol Bioeng* 19: 57-61.
  33. Jeong CH, Bae YI, Shim KH, Choi JS. 2004. DPPH radical scavenging effect and antimicrobial activity of plantain (*Plantago asiatica* L.) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1601-1605.
  34. Lee HJ, Lee BJ, Lee DS, Seo TW. 2003. DPPH radical scavenging effect and *in vitro* lipid peroxidation inhibition by *Potulaca oleracea*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 165-169.
  35. Ames BN, Shigenoga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7915-7922.
  36. Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2: 298-300.
  37. Shin MO, Bae SJ. 2009. The anticarcinogenic and antioxidative activity of *Hemicentrotus pulcherrimus* fractions in various cancer cells. *J Lié Sci* 19: 607-614.
  38. Kang DY, Shin MO, Shon JH, Bae SJ. 2009. The antioxidative and antimicrobial effects of *Celastrus orbiculatus*. *J Lié Sci* 19: 52-57.
  39. Carr AC. 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1716-1723.
  40. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Chio JS, Yu BP. 2002. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Techniq* 59: 264-272.
  41. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. 1997. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commu* 232: 164-170.

(2010년 9월 3일 접수; 2010년 10월 13일 채택)