

## 채취시기와 크기에 따른 주름 미더덕의 항산화 및 항고혈압 활성

박지원<sup>1</sup> · 유동현<sup>1</sup> · 배명숙<sup>1</sup> · 김정미<sup>2</sup> · 이종화<sup>3</sup> · 김석주<sup>4</sup> · 진유진<sup>5</sup> · 박은주<sup>2</sup> · 이승철<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경남대학교 식품생명학과, <sup>2</sup>경남대학교 식품영양학과  
<sup>3</sup>안동대학교 식품생명공학과, <sup>4</sup>우송정보대학 식품영양조리과  
<sup>5</sup>제주대학교 해양의생명과학부

### Antioxidant and Antihypertensive Activities of *Styela plicata* according to Harvesting Time and Size

Ji-Won Park<sup>1</sup>, Dong-Hyun You<sup>1</sup>, Myung-Suk Bae<sup>1</sup>, Jungmi Kim<sup>2</sup>, Jong-Hwa Lee<sup>3</sup>,  
Suk-Ju Kim<sup>4</sup>, Yuo-Jin Jeon<sup>5</sup>, Eunju Park<sup>2</sup>, and Seung-Cheol Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Biotechnology, <sup>2</sup>Dept. of Food and Nutrition,  
Kyungnam University, Gyeongsang 631-701, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Gyeongbuk 760-749, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Food Nutrition and Cookery, Woosong Information College, Daejeon 300-715, Korea

<sup>5</sup>Faculty of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

*Styela plicata* of large (9.82~11.66 g) and small (0.93~2.21 g) sizes harvested at different times was extracted with 4 different solvents (methanol, ethanol, acetone, and water). DPPH radical scavenging and reducing power was the highest in acetone extracts of small ones (38.98% and 1.724, respectively) harvested in November. The lowest radical scavenging activity was found in water extracts of large ones (12.03% and 0.114) in December. On the other hand, large ones harvested in September showed significantly higher inhibition rate of DNA damage (water, 56.54%; methanol, 55.83%; ethanol, 48.63%) than others. Overall, the water extraction of *S. plicata* tended to show a higher antigenotoxic effect. In addition, water extracts of large *S. plicata* from November showed the highest angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity (64.38%), while that of small ones from December exhibited the lowest (51.33%). Overall the results indicate that antioxidant and antihypertensive activities *S. plicata* are variable depending on harvesting time, size, and extraction solvent.

**Key words:** *Styela plicata*, antioxidant activity, antihypertensive activity, harvesting time, size

#### 서 론

주름 미더덕(*Styela plicata*)은 척삭동물문의 해초강, 측성해초목 미더덕과(Styelidae)에 속한다. 주름 미더덕은 우리나라와 일본을 비롯한 세계전역에서 자생하며 우리나라에서는 오만둥이 또는 흰명게라고도 불리어진다. 미더덕과 비교하여 원형에 가깝고 꼬리가 없으며, 껍질 표면의 돌기가 굵고 다소 열은 빛깔을 띠고 있고, 물이 들어오고 나가는 입수공(入水孔)과 출수공(出水孔)이 몸 밖으로 나와 있지 않다(1,2). 외피의 표면에는 오돌토돌한 돌기로 덮여 있으며 개체별로 차이가 있고 불규칙한 홈이나 주름이 있다. 황갈색을 띠며 섬유질과 같은 물질로 되어 있고 딱딱하다. 주름 미더덕의 몸길이는 1~10 cm이며, 7~9월에 산란하고 10~12월에 수확하여 식용한다. 주로 몸은 원형에 가까우나 불규칙한 형태를 띠기도 한다. 3 cm 이하의 작은 주름 미더덕은 전체

로 이용되지만, 그 이상 것들은 잘게 썰어서 이용된다. 주름 미더덕의 향은 미더덕보다는 덜 하지만, 겉껍질은 미더덕보다는 단단하고, 맛도 미더덕보다는 씹히는 맛이 더 있는 편이다. 독특한 향과 맛을 가지고 있어 주로 찜이나 된장찌개 등의 재료로 식품에 널리 이용되고 있다(3). 주름 미더덕의 정미 성분 중 핵산관련물질로는 AMP와 IMP가 다량 함유되어 있고, 유리 아미노산으로는 proline, alanine, glutamic acid 및 serine의 함량이 매우 높다(4).

주름 미더덕으로부터 plicatamide라는 octapeptide인 항균 펩티드가 보고되었으며(5), heparin과 dermatan sulfate가 함유되어 항응고에 관한 효능도 발표되었다(6,7). 이외에도 주름 미더덕에 관한 다양한 생리활성 연구가 이루어졌는데, 추출 용매와 가공방법에 따른 주름 미더덕 추출물의 항산화 효과(1,8) 및 세포독성에 관한 연구(9), 항유전 독성 및 대장암 억제효과(10), 물 추출물의 첨가량에 따른 TNF- $\alpha$

\*Corresponding author. E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr  
Phone: 82-55-249-2684, Fax: 82-0505-999-2171

생산 촉진 효과(11), 알코올로 인한 흰쥐의 간 DNA 손상 억제 효과(12) 등이 국내에서 보고되었다. 주름 미더덕의 가공식품으로는 어묵의 제조(13), 술의 제조(14), 된장찌개에서의 향미 활성물질 분석(15) 등이 있다.

주름 미더덕과 유사한 일반 미더덕의 경우 채취시기에 따라 항산화능 및 항고혈압능의 기능이 다른 것이 이미 보고되었다(16). 주름 미더덕도 생산 시기가 여름부터 초겨울까지 광범위하며, 생산 환경이 여러 기능성에 영향을 미칠 것으로 추정된다. 한편, 주름 미더덕은 크기에 따라 작은 것은 비교적 상품 가치가 떨어져서 이의 기능성을 규명하여 산업적 활용을 향상시킬 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 주름 미더덕의 채취시기인 8~12월 사이의 기간 중 매 1개월마다 채취한 주름 미더덕을 크기별로 구분하여 4가지(메탄올, 에탄올, 아세톤, 물) 용매로 추출한 후 항산화능, 항유전 독성능과 항고혈압능을 분석하여 기능성 소재로 활용될 때의 최적 조건을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 주름 미더덕은 미더덕 영업조합법인(Changwon, Korea)에서 2009년 8월부터 12월까지 월별로 구입하였다. 분석에 이용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)와 potassium ferricyanide, trichloroacetic acid(TCA), ferric chloride, dimethyl sulfoxide(DMSO), angiotensin converting enzyme(ACE)을 얻기 위한 rabbit lung acetone powder, hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HLL) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic은 Daejung Chemical Co.(Siheung, Korea)에서 구입하였으며, 추출에 이용된 용매는 모두 1급 이상의 등급을 사용하였다.

### 주름 미더덕 추출물 제조

구입한 주름 미더덕은 이물질을 제거하고 물로 깨끗이 여러 번 씻어 물기를 제거한 후, 크기별로 큰 것(9.82~11.66 g)과 작은 것(0.93~2.21 g)으로 나눈 뒤 각각을 분쇄기(HR2870, Philips Electronics, Eindhoven, Netherlands)로 분쇄하였다. -70°C에서 동결한 후 동결건조기(FD 5512, Ilshin Lab Co., Seoul, Korea)로 건조하였다. 건조한 주름 미더덕을 다시 분쇄기(Mixer HR 2870, Philips Electronics)를 이용하여 분말로 만들어 27 mesh의 체로 걸러 분말의 크기를 일정하게 하였다. 각각의 시료 50 g에 1 L의 용매(메탄올, 에탄올, 아세톤, 증류수)를 각각 가하여 진탕배양기(HB-201s, Han-back Co., Seoul, Korea)에서 25°C, 100 rpm의 조건으로 24시간 동안 추출하였다. 각각의 추출 시료는 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 회전공농축기(Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 37°C에서 농축하였다. 각

농축물은 50 mg/mL의 농도로 100% DMSO에 녹인 후 4°C에서 보관하였고, 분석할 때는 DMSO로 희석하여 시료로 사용하였다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능은 Jeong 등의 방법(17)에 준하여 시료 0.1 mL에  $4.1 \times 10^{-5}$  M의 DPPH 용액 0.9 mL를 가한 후 상온에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 아래의 식에 의해 라디칼 소거능으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{라디칼 소거능 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무처리 구의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 환원력 측정

환원력은 Oyaizu의 방법(18)에 따라 측정하였다. 즉, 1 mL의 인산염 완충 용액(0.2 M, pH 6.6)에 1 mL의 주름 미더덕 추출물과 1%(w/v) potassium ferricyanide 용액 1 mL을 가하고 이 혼합물을 50°C에서 20분간 반응을 시킨 후, 10%(w/v) trichloroacetic acid 용액 1 mL을 넣었다. 반응이 끝난 혼합물을 14,200×g, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액 1 mL과 증류수 1 mL을 넣고 0.1% 염화철(ferric chloride) 용액 0.1 mL을 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### DNA 손상 측정(Comet assay)

**혈액 내 백혈구 세포 분리:** 신선한 전혈 5 mL을 His-topaque 1077(Sigma-Aldrich Co.)를 이용해 백혈구만을 분리해 낸 후 본 실험에 사용하였다.

**시료의 처리 및 산화적 스트레스 유발:** 준비된 백혈구 세포에 각 시료를 50 µg/mL의 농도로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시켰다(10). 반응이 끝난 후 백혈구를 PBS로 세척한 후 인위적으로 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 200 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 백혈구에 처리하여 4°C에 5분간 반응시킨 다음 다시 PBS로 세척하였다. 양성 대조구를 위해 주름 미더덕 시료 대신 용매인 DMSO를 처리한 후 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였고, 음성 대조구 세포에는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않았다.

**DNA 손상 측정:** Comet assay를 위해 반응을 끝낸 백혈구를 75 µL의 0.7% low melting agarose(LMA) gel과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 미리 코팅된 슬라이드 위로 세포 현탁액과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 덮개 유리로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. 겔이 굳으면 덮개 유리를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 µL로 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 슬라이드를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 이중 가닥을 풀었다. Lysis가 끝난 후, 슬라이드를 전기영동 탱크에 배열하고 4°C의 차가운 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13)를 채워 20분 동안 unwinding시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을

걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 탱크를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 슬라이드를 건조시켰다. 20 µL/mL 농도의 EtBr로 핵을 염색하여 덮개 유리로 덮은 뒤 형광현미경(Leica Camera, Solms, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD 카메라(Nikon Co., Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 영상은 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging Ltd., Nottingham, UK)이 설치된 컴퓨터에서 분석하였다. 백혈구의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 손상 및 미더덕 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA % 함량을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 슬라이드를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

#### ACE 저해능 측정

ACE 저해 활성 측정은 Cushman과 Cheung(19)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 20 mL에 1 g의 rabbit lung acetone powder를 4°C에서 24시간 동안 교반한 후, 10분간 원심분리(4°C, 5,000×g)하여 ACE 조효소액을 얻었다. 1, 5 그리고 10 mg/mL 농도로 희석한 주름 미더덕의 물 추출물 50 µL에 ACE 조효소액 50 µL를 가한 37°C에서 10분간 예비 반응시킨 후, 25 mM HHL 100 µL를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 1 M HCl 250 µL를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 0.5 mL를 가해 30초간 교반한 후 원심분리(3,000×g, 10 분, 4°C)하여 상등액 200 µL를 얻었다. 이 상등액을 80°C에서 30분간 완전히 건조시켜 증류수 1 mL를 넣은 후에 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서는 추출물 대신 추출용매 50 µL를 가해 실험하였으며, ACE 저해활성 효과는 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{저해능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 통계처리

DPPH 라디칼 소거능, 환원력, 그리고 ACE 저해 활성에 대한 데이터의 통계처리는 각 시료 당 3회 반복으로 행해졌으며, SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 평균과 표준오차, Student-Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검정하였다(20). 각 시료 처리에 따른 DNA 손상 정도는 ANOVA를 시행한 후 Duncan's multiple range test를 통해 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

#### 건조 및 추출 수율

주름 미더덕을 생산 시기에서 각 1개월 간격으로 채취하

Table 1. Solid contents of *Styela plicata* according to harvesting time and size (unit: %)

Size <sup>1)</sup>	Harvesting time				
	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Large	7.30	8.13	6.52	6.18	7.44
Small	6.34	13.02	7.18	6.71	8.10

<sup>1)</sup>Large size, 9.82~11.66 g; small size, 0.93~2.21 g.

Table 2. Extraction yield of *Styela plicata* according to harvesting time, size, and extraction solvent (unit: %)

Size <sup>1)</sup>	Solvents for extraction	Harvesting time				
		Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Large	Acetone	1.53	1.42	1.66	2.00	2.40
	Ethanol	16.75	11.91	15.43	18.68	21.52
	Methanol	32.51	32.34	38.96	49.16	37.42
	Water	55.33	55.80	65.33	85.72	63.70
Small	Acetone	1.46	1.80	1.90	1.50	1.16
	Ethanol	9.20	13.80	19.37	16.25	16.52
	Methanol	15.06	22.38	37.35	35.45	32.60
	Water	44.66	50.04	47.60	22.10	45.38

<sup>1)</sup>Large size, 9.82~11.66 g; small size, 0.93~2.21 g.

여 크기에 따라 대, 소로 나누어 건조한 후 고형분 함량을 Table 1에 나타내었다. 전체적으로 볼 때 8월을 제외하고는 작은 크기의 주름 미더덕이 큰 것보다 고형분 함량이 높았다. 특히, 9월에는 큰 것과 작은 것 모두 해당 크기에서 가장 고형분 함량이 높았고, 9월의 작은 주름 미더덕이 13.02%의 가장 높은 값을 보였다. 10월, 11월에 고형분 함량이 감소하다가 12월에 다시 증가하는 현상을 보이는데, 이는 7~9월에 산란하며 10~12월에 성장하는 주름 미더덕의 생활사와 관계가 있는 것으로 보인다. 일반 미더덕의 경우에도 채취시기에 따라 고형분 함량이 달랐고 이는 생활상에 따른 것으로 보았다(20).

건조한 주름 미더덕으로부터 네 가지 용매(메탄올, 에탄올, 아세톤, 증류수)를 이용하여 추출물을 제조하였을 때의 수율을 Table 2에 나타내었다. 용매 별로 볼 때 물>메탄올>에탄올>아세톤의 순으로 추출 수율이 높았는데 이는 Kim 등(1)의 결과와 대체로 일치하였다. 물과 메탄올의 경우에는 크기가 큰 것이 작은 것보다 수율이 높았고, 에탄올과 아세톤 간에 조금의 차이는 있지만 크기가 크게 영향을 미치지 않았다. 가장 높은 추출 수율은 11월에 채취한 큰 크기의 주름 미더덕의 건조품에서 물로 추출한 경우 85.72%이었다. 이는 시기, 크기에 따라 주름 미더덕 구성물들의 극성에 차이가 있음을 의미한다. 큰 주름 미더덕의 경우 11월과 12월의 것이 높은 수율을 보였고, 8월과 9월의 것들이 낮은 수율을 보였다.

#### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH는 천연 항산화제의 유리 라디칼 소거능을 평가하는데 일반적으로 사용된다(21). 주름 미더덕의 채취시기, 크기, 추출 용매에 따른 추출물의 10 mg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거능은 Table 3에 나타내었다. 11월과 12월에 채취

Table 3. DPPH radical scavenging activity of extracts of *Styela plicata* according to harvesting time, size, and extraction solvent (unit: %)

Size <sup>1)</sup>	Solvents for extraction	Harvesting time				
		Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Large	Acetone	30.03±1.08 <sup>cw</sup>	35.94±1.22 <sup>ax</sup>	28.41±1.12 <sup>av</sup>	44.59±0.73 <sup>az</sup>	40.93±0.94 <sup>ay</sup>
	Ethanol	34.32±0.81 <sup>bz</sup>	27.00±0.74 <sup>by</sup>	20.46±0.71 <sup>bw</sup>	22.78±1.97 <sup>bx</sup>	16.03±0.70 <sup>cv</sup>
	Methanol	25.32±0.10 <sup>dz</sup>	18.85±0.73 <sup>dx</sup>	16.81±1.18 <sup>dw</sup>	13.64±0.31 <sup>dv</sup>	22.98±0.53 <sup>by</sup>
	Water	40.01±1.01 <sup>az</sup>	24.05±0.18 <sup>cy</sup>	18.71±0.36 <sup>cx</sup>	16.67±0.35 <sup>cw</sup>	12.03±0.58 <sup>dv</sup>
Small	Acetone	25.49±0.69 <sup>dv</sup>	33.26±0.73 <sup>bx</sup>	27.33±0.74 <sup>cw</sup>	38.98±3.92 <sup>az</sup>	35.24±0.52 <sup>ay</sup>
	Ethanol	37.99±0.87 <sup>az</sup>	35.81±0.62 <sup>ay</sup>	32.98±0.80 <sup>ax</sup>	30.37±0.65 <sup>cv</sup>	32.34±0.32 <sup>bw</sup>
	Methanol	32.13±0.44 <sup>cz</sup>	26.91±0.96 <sup>cx</sup>	20.06±0.43 <sup>dv</sup>	21.96±0.87 <sup>dw</sup>	30.08±2.87 <sup>cy</sup>
	Water	32.98±2.56 <sup>by</sup>	24.93±1.54 <sup>dw</sup>	29.66±8.23 <sup>bx</sup>	38.42±0.83 <sup>bz</sup>	18.22±1.18 <sup>dv</sup>

<sup>1)</sup>Large size, 9.82~11.66 g; small size, 0.93~2.21 g.

DPPH radical scavenging activity in this study was carried out at concentration of 10 mg/mL of sample. Different letters within a column (a-d) and a row (v-z) indicate significant difference (p<0.05), n=3.

한 주름 미더덕의 아세톤 추출물이 비교적 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 그중에서도 11월의 크기가 큰 주름 미더덕의 아세톤 추출물이 44.59%로 가장 높았으며, 큰 미더덕의 12월과 8월의 아세톤과 물 추출물이 40.93%와 40.01%로 뒤를 이었다. 신선한 주름 미더덕의 DPPH 라디칼을 조사하였을 때 아세톤 추출물이 다른 용매에 비해 높았고 (1), 주름 미더덕의 아세톤 추출물이 대장암 세포주 HT-29에 대해 높은 세포 독성을 나타낸 것으로 볼 때 (9) 앞으로 주름 미더덕의 아세톤 추출물에 대한 추가 연구가 기대된다. 일반 미더덕의 경우에도 채취시기와 추출 용매에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 달랐으며, 본 연구와 같은 농도(10 mg/mL)에서 미더덕 육질 부위의 물 추출물은 4월에 채취한 것이 53.02%로 가장 높았으며 껍질 부위는 같은 조건에서 22.43%이었다(16). 한편, 양성 대조구로 비타민 C를 이용하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정 한 결과 IC<sub>50</sub> 값이 28.8±0.2 µg/mL이었다.

환원력 측정

항산화 활성의 여러 가지 기작 중에서 활성 산소종 및 유리기에 전자를 공여하는 능력을 환원력이라고 하며, 어떤 물질의 환원력은 항산화 활성에 대한 중요한 인자로 작용한다(22). 채취시기, 크기, 추출 용매에 따른 주름 미더덕 추출물의 10 mg/mL 농도에서 환원력은 Table 4에 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거능의 경우와 비슷하게 11월에 채취된 주름 미더덕의 아세톤 추출물에서 가장 높은 환원력을 보였는데, 큰 것은 1.097, 작은 것은 1.724로 작은 것이 더 좋은 활성을 나타내었다. 양성 대조구로 비타민 C의 환원력의 경우에 IC<sub>50</sub> 값은 24.0±0.2 µg/mL이었다. DPPH 라디칼 소거능과 환원력의 상관관계를 분석하였을 때 큰 주름 미더덕은 r<sup>2</sup>=0.633(p<0.05)의 상관계수를 보였으며, 작은 것은 r<sup>2</sup>=0.284(p<0.05)의 상관계수로 큰 것보다 낮았다. 이는 항산화 물질의 작용이 연쇄 반응 개시의 방해, 전이 금속 물질의 결합, 과산화물의 분해, 라디칼 소거 등(23)의 여러 기작과 연관이 있으므로 측정 방법에 따라 차이가 나기 때문이다.

DNA 손상 측정

Comet assay는 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 1984년 Ostling과 Johanson(24)에 의해 도입된 micro gel electrophoresis 방법으로 micronuclei(MN), chromosomal aberration(CA), sister chromatid exchanges(SCE), 8-OHdG법에 비해 비교적 간단한 방법으로 DNA 손상을 민감하게 감지해 낼 수 있다. 그 후 Singh 등(25)에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지할 수 있도록 변경되었으며 이는 *in vitro*, *in vivo* 연구뿐 아니라 분자 역학적인 분야에서 다양하게 활용되고 있다. 본 연구에서는 Singh 등(25)의 방법대로 comet assay를 수행하여 다양한 주름 미더

Table 4. Reducing power of extracts of *Styela plicata* according to harvesting time, size, and extraction solvent (unit: O.D)

Size <sup>1)</sup>	Solvents for extraction	Harvesting time				
		Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Large	Acetone	0.249±0.01 <sup>dw</sup>	0.908±0.01 <sup>ax</sup>	0.987±0.01 <sup>av</sup>	1.097±0.03 <sup>az</sup>	0.998±0.01 <sup>ay</sup>
	Ethanol	0.714±0.02 <sup>az</sup>	0.629±0.02 <sup>by</sup>	0.504±0.02 <sup>bw</sup>	0.547±0.01 <sup>bx</sup>	0.565±0.01 <sup>bv</sup>
	Methanol	0.612±0.01 <sup>cz</sup>	0.364±0.01 <sup>cx</sup>	0.201±0.04 <sup>cw</sup>	0.158±0.01 <sup>cv</sup>	0.334±0.02 <sup>cy</sup>
	Water	0.643±0.06 <sup>bz</sup>	0.141±0.01 <sup>dy</sup>	0.151±0.01 <sup>dx</sup>	0.117±0.01 <sup>dw</sup>	0.114±0.01 <sup>dv</sup>
Small	Acetone	0.355±0.01 <sup>cv</sup>	1.131±0.01 <sup>ax</sup>	1.111±0.04 <sup>aw</sup>	1.724±0.02 <sup>az</sup>	1.021±0.01 <sup>ay</sup>
	Ethanol	0.597±0.01 <sup>bz</sup>	0.656±0.01 <sup>by</sup>	0.569±0.01 <sup>bx</sup>	0.717±0.01 <sup>bv</sup>	0.560±0.01 <sup>bv</sup>
	Methanol	0.644±0.01 <sup>az</sup>	0.433±0.01 <sup>cx</sup>	0.307±0.01 <sup>cv</sup>	0.338±0.01 <sup>cw</sup>	0.441±0.01 <sup>cy</sup>
	Water	0.313±0.01 <sup>dy</sup>	0.173±0.01 <sup>dw</sup>	0.220±0.01 <sup>dx</sup>	0.333±0.01 <sup>dz</sup>	0.179±0.01 <sup>dv</sup>

<sup>1)</sup>Large size, 9.82~11.66 g; small size, 0.93~2.21 g.

Reducing power in this study was carried out at concentration of 10 mg/mL of sample. Different letters within a column (a-d) and a row (v-z) indicate significant difference (p<0.05), n=3.

Table 5. Antigenotoxic effect of extracts of *Styela plicata* according to harvesting time, size, and extraction solvent (unit: tail intensity %)

Size <sup>1)</sup>	Solvents for extraction	Harvesting time				
		Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Large	Acetone	12.95±0.45 <sup>aw</sup>	13.48±0.09 <sup>awx</sup>	14.74±0.49 <sup>by</sup>	13.96±0.38 <sup>bx</sup>	20.84±1.88 <sup>az</sup>
	Ethanol	13.84±0.70 <sup>ax</sup>	12.34±0.65 <sup>aw</sup>	21.25±1.53 <sup>az</sup>	17.43±1.15 <sup>ay</sup>	17.86±1.55 <sup>ay</sup>
	Methanol	11.69±0.31 <sup>bx</sup>	10.61±0.78 <sup>bx</sup>	15.04±0.35 <sup>byz</sup>	16.61±2.56 <sup>az</sup>	14.22±0.14 <sup>by</sup>
	Water	11.90±0.65 <sup>bxy</sup>	10.44±0.67 <sup>bx</sup>	16.25±1.8 <sup>bz</sup>	14.66±2.31 <sup>abyz</sup>	11.94±0.34 <sup>xy</sup>
Small	Acetone	12.54±0.99 <sup>ay</sup>	15.93±0.77 <sup>az</sup>	15.60±0.47 <sup>az</sup>	11.95±1.24 <sup>by</sup>	16.56±0.20 <sup>az</sup>
	Ethanol	13.38±0.74 <sup>axy</sup>	14.36±0.37 <sup>by</sup>	16.20±1.36 <sup>az</sup>	12.22±0.11 <sup>by</sup>	10.25±1.21 <sup>cx</sup>
	Methanol	13.81±1.67 <sup>ay</sup>	15.55±0.31 <sup>az</sup>	9.43±0.78 <sup>cx</sup>	14.43±0.05 <sup>by</sup>	7.86±1.11 <sup>dx</sup>
	Water	10.69±0.71 <sup>bz</sup>	12.87±1.54 <sup>cz</sup>	13.19±0.50 <sup>bz</sup>	12.99±1.68 <sup>bz</sup>	13.57±0.89 <sup>bz</sup>

<sup>1)</sup> Large size, 9.82~11.66 g; small size, 0.93~2.21 g.

Different letters within a column (a-d) and a row (w-z) indicate significant difference (p<0.05), n=3.

Tail intensity of DMSO-treated negative control and 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated positive control was 6.40±0.20 and 24.02±0.33%, respectively.

덕 추출물의 DNA 손상 억제 효과를 확인하였다(Table 5). 채취시기에 따른 DNA 손상 억제 효과의 차이는 큰 주름 미더덕의 아세톤과 에탄올 추출물에서 현저한 반면, 작은 주름 미더덕의 경우 모든 용매 추출물에서 그 차이가 미미했으며 특히 작은 주름 미더덕의 물 추출물은 채취시기에 따른 차이가 전혀 나타나지 않았다. 또한 8월 또는 9월 채취한 큰 주름 미더덕의 DNA 손상 억제효과는 월등하였으며 특히 9월에 채취한 것의 물, 메탄올, 에탄올 추출물은 인위적으로 산화적 스트레스를 유도한 양성 대조구에 대한 DNA 손상 저해율이 각각 56.54, 55.83, 48.63%로 나타나 항유전 독성 효과가 큼을 알 수 있었다. 이러한 결과는 DPPH 라디칼 소거능 및 환원력이 11~12월 채취한 주름 미더덕이 더 효과적이었던 것과 대조되는 결과로써 *ex vivo*에서 나타난 항유전 독성 결과는 *in vitro* 라디칼 소거능, 환원력에 기여한 것으로 여겨지는 주름 미더덕 내 β-carotene, β-cryptoxanthin, zeaxanthin 등을 비롯한 carotenoids류 외 다른 잠재적인 성분에서 비롯된 결과로 사료되며 이를 뒷받침할 추후 연구가 필요할 것이다. 한편 주름 미더덕의 DNA 손상 억제 효과에 있어서 추출 용매에 따른 차이는 11월 채취한 큰 주름 미더덕과 작은 주름 미더덕에서는 유의적인 차이가 없는 등 대체적으로 그 차이가 미미한 것으로 나타났지만 큰 주름 미더덕의 9월 또는 12월, 작은 주름 미더덕의 8월 또는 9월의 물 추출물은 다른 용매 추출물에 비해 DNA 손상 억제효과가 큰 경향을 보이며 특히 12월 채취한 큰 주름 미더덕의 물

추출물은 DNA 손상 저해율이 50.30%로 아세톤 추출물 13.24%에 비해 현저하게 높은 것을 알 수 있었다.

#### ACE 저해능 측정

Angiotensin I은 angiotensin converting enzyme(ACE)에 의해 angiotensin II로 전환되어 혈압 상승의 원인이 되며(26), ACE 활성을 저해함으로써 혈압 상승을 막을 수 있다(27). ACE 효소 활성은 수용액으로 분석하므로 주름 미더덕의 채취시기에 따른 크기별 물 추출물만을 이용하여 분석한 결과를 Table 6에 나타내었다. 모든 경우에서 주름 미더덕 물 추출물의 농도가 증가할수록 ACE 저해능은 증가하였다. 채취 시기별로는 8~9월 사이의 것보다는 10~12월의 주름 미더덕 추출물에서 ACE 저해능이 높았다. 12월을 제외하고는 대체로 큰 주름 미더덕이 작은 것보다 높은 ACE 저해능을 보였는데, 가장 높은 ACE 저해능은 11월에 채취한 큰 주름 미더덕 추출물의 10 mg/mL의 농도에서 63.38%이었다. 가장 낮은 경우는 9월의 작은 주름 미더덕 추출물이 10 mg/mL의 농도에서 10.29%이었다. Lee 등(16)은 일반 미더덕의 경우에도 농도가 증가함에 따라 ACE 저해능도 증가하였고, 3월의 육질부위 추출물의 10 mg/mL의 농도에서 65.22%로 가장 높았고, 채취시기, 부위, 추출 용매에 따라 다른 ACE 저해 활성을 보인다고 하였다.

이상의 결과로 주름 미더덕이 채취시기와 크기에 따라 구성물이 달라지면서 항산화 또는 ACE 저해능과 같은 생리활

Table 6. ACE inhibitory activity of water extract of *Styela plicata* according to harvesting time and size (unit: %)

Size <sup>1)</sup>	Conc. (mg/mL)	Harvesting time				
		Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
Large	1	17.15±0.05 <sup>cy</sup>	5.41±0.01 <sup>cx</sup>	31.01±0.01 <sup>cz</sup>	3.65±0.04 <sup>cw</sup>	1.52±0.01 <sup>cv</sup>
	5	23.45±0.08 <sup>bw</sup>	5.49±0.01 <sup>bv</sup>	31.50±0.01 <sup>bx</sup>	48.78±0.01 <sup>bz</sup>	33.19±0.01 <sup>by</sup>
	10	35.00±0.03 <sup>aw</sup>	10.75±0.02 <sup>av</sup>	50.88±0.03 <sup>ay</sup>	64.38±0.01 <sup>az</sup>	45.77±0.01 <sup>ax</sup>
Small	1	9.55±0.04 <sup>cy</sup>	1.93±0.04 <sup>cw</sup>	0.41±0.01 <sup>cv</sup>	14.61±0.03 <sup>cz</sup>	6.73±0.01 <sup>cx</sup>
	5	13.04±0.10 <sup>bx</sup>	9.31±0.05 <sup>bv</sup>	5.11±0.01 <sup>bv</sup>	32.24±0.01 <sup>by</sup>	37.88±0.02 <sup>bz</sup>
	10	17.47±0.01 <sup>aw</sup>	10.29±0.01 <sup>av</sup>	20.39±0.01 <sup>ax</sup>	39.79±0.03 <sup>ay</sup>	51.33±0.03 <sup>az</sup>

<sup>1)</sup> Large size, 9.82~11.66 g; small size, 0.93~2.21 g.

Different letters within a column (a-c) and a row (v-z) indicate significant difference (p<0.05), n=3.

성 기능이 달라짐을 알 수 있었다. 특히 11월에 채취한 주름 미더덕이 다른 시기에 비해 비교적 항산화력과 ACE 저해능이 높았다. 향후 주름 미더덕의 기능성을 활용할 제품을 개발할 때에는 시기를 잘 선택함이 중요함을 시사한다.

## 요 약

주름 미더덕(*Styela plicata*)을 8월부터 12월까지 매월 1회 채취하여 크기에 따라 큰 것(9.82~11.66 g)과 작은 것(0.93~2.21 g)으로 분류한 후 네 가지 용매(메탄올, 에탄올, 아세톤, 물)로 각각 추출·농축하여 추출물을 제조하였다. 각 추출물의 항산화 활성과 항고혈압 활성을 DPPH 라디칼 소거능과 환원력, 그리고 ACE 저해능으로 분석하였다. DPPH 라디칼 소거능은 11월에 채취된 큰 주름 미더덕의 아세톤 추출물이 가장 높았고, 환원력은 11월의 작은 미더덕의 아세톤 추출물이 가장 높았다. ACE 저해능은 물 추출물로만 측정하였는데, 11월에 채취된 큰 주름 미더덕의 추출물이 가장 높았다. 또한 주름 미더덕은 채취시기, 크기, 추출용매에 상관없이 거의 모든 시료에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 백혈구의 DNA 손상을 억제하는 것으로 나타났으며 그 효과는 특히 8월 또는 9월에 채취한 큰 주름 미더덕이 월등함을 알 수 있었다. 또한 DNA 손상 억제에 있어서 추출 용매별 차이는 미미한 것으로 나타났으며 오히려 일부 물 추출물은 다른 용매 추출물에 비해 그 효과가 큰 것으로 나타나 끓이기 등의 일상 조리법을 통한 주름 미더덕의 유효 성분 섭취를 기대할 수 있겠다. 이상의 결과로 채취시기, 크기, 용매에 따라 항산화, 항유전 독성 및 ACE 저해능의 차이가 있으며, 이는 주름 미더덕을 기능성 소재로 활용할 때 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 해양과학기술연구개발사업의 연구비지원(과제번호 20080105)에 의해 수행되었습니다.

## 문 헌

- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
- Lee EH. 1985. Lipid components of sea squirt, *Halcyntria roretzi*, and Mideuduck, *Styela clava*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 289-294.
- Park SM, Seo HK, Lee SC. 2006. Preparation and quality properties of fish paste containing *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1256-1259.
- Lee EH, Chung SK, Jeon JK, Cha YJ, Chung SY. 1983. A study on the taste compounds of an ascidian, *Styela plicata*. *Korean J Food Sci Technol* 15: 1-5.
- Tincu JA, Menzel LP, Azimov R, Sands J, Hong T, Waring AJ, Taylor SW, Lehrer RI. 2003. Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocyte. *J Biol Chem* 278: 13546-13553.
- Cavalcante MCM, Allode S, Valente AP, Strausi AH, Takahashi HK, Mourão PAS, Pavão MSG. 2000. Occurrence of heparin in the *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. *J Biol Chem* 275: 36189-36196.
- Pavão MSG, Aiello KRM, Werneck CC, Silva LCF, Valente AP, Mulloy B, Colwelli NS, Tollefseni DM, Mourão PAS. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. *J Biol Chem* 273: 27848-27857.
- Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata* according to the processing methods and solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
- Lee BB, Cha MR, Park HR, Lee SC. 2007. In vitro cytotoxic effect of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1099-1105.
- Seo BY, Kim JM, Lee SC, Park E. 2009. Antigenotoxic and anticarcinogenic effects of *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 839-845.
- Seo HH, Lee BB, Lee SC. 2009. Antioxidant and TNF- $\alpha$  inducing ability of *Styela plicata* extracts. *J Life Sci* 19: 462-466.
- Kim JM, Park HR, Lee SC, Park E. 2007. Ethanol induced leucocytic and hepatic DNA strand breaks are prevented by *Styela clava* and *Styela plicata* supplementation in male SD rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1271-1278.
- Park SM, Seo HK, Lee SC. 2006. Preparation and quality properties of fish paste containing *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1256-1260.
- Jung ES, Lee SC. 2007. Preparation and characterization of liquors prepared with *Styela calva* and *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1038-1042.
- Joeng EJ, Cho WJ, Cha YJ. 2008. Aroma active compounds in *Omandungi* (*Styela plicata*)-Doenjang (soybean paste) stew. *J Kor Fish Soc* 41: 414-418.
- Lee DW, You DH, Yang EK, Jang IC, Bae MS, Jeon YJ, Kim SJ, Lee SC. 2010. Antioxidant and ACE inhibitory activities of *Styela clava* according to harvesting time. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 331-336.
- Jeong SM, Kim SY, Park HR, Lee SC. 2004. Effect of far-infrared radiation on the activity of extracts from *Citrus unshiu* peels. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1580-1583.
- Oyaizu M. 1996. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
- Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
- SAS Institute. 1995. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Bondet V, Brand-Williams W, Bereset C. 1997. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical methods. *Lebensm-Wiss Technol* 30: 609-615.
- Mier S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J Agric Food Chem* 43: 1813-1819.
- Diplock AT. 1997. Will the good fairies please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radic Res* 27: 511-532.
- Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.

25. Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
26. Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. 2000. Classification and antihypertensive activity of anagiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci* 65: 564-569.
27. Corvol P, Jeunemaitre X, Charru A, Kotelevtsev Y, Soubrier F. 1995. Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: new insights from molecular genetics. *Recent Prog Horm Res* 50: 287-308.

(2010년 12월 15일 접수; 2011년 3월 1일 채택)