

Biological Analysis of Enzymatic Extracts from *Capsosiphon Fulvescens* Using the *Microbulbifer* sp. AJ-3 Marine Bacterium

Jeong Mi Bae[†], Eun Kyung Cho[†], Hye Youn Kim, Su Hee Kang and Young Ju Choi*

Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received February 24, 2012 / Revised May 22, 2012 / Accepted May 22, 2012

Microbulbifer sp. AJ-3 was used to acquire the degrading products from *Capsosiphon fulvescens* (DPCF), which were investigated to determine its physiological activities. A crude enzyme extract from *Microbulbifer* sp. AJ-3 hydrolyzes polysaccharide substrates such as agar, agarose, alginic acid, fucoidan, laminaran, starch, and chitin. Among them, agarose, laminaran, and alginic acid showed higher activities, especially alginic acid. The antioxidant activity of DPCF was measured by using 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and superoxide dismutase (SOD)-like activities and were about 32% and 93% at 2 mg/ml, respectively. In addition, the nitrite-scavenging activity of DPCF was about 82%, 53%, and 12% at pH levels of 1.2, 3.0, and 6.0, respectively. To determine the influence of DPCF on alcohol metabolism, the generating activity of reduced-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by alcohol dehydrogenase (ADH) was measured. The facilitating rate of ADH activity by DPCF was 130% at 2 mg/ml. The tyrosinase inhibitory activity of DPCF was slightly increased in a dose-dependent manner and was about 28% at 2 mg/ml. These results indicated that the enzymatic products from DPCF have a strong antioxidant, nitrite scavenging, and alcohol metabolizing activity.

Key words : *Capsosiphon fulvescens*, polysaccharide-degrading enzymes, enzymatic hydrolysis, antioxidative activity, ADH activity

서 론

최근 경제수준과 의식수준의 향상에 따라 식생활과 보건 의료에 있어 기호가 다양해지고 고급화, 간편화 및 건강화를 지향하면서 새로운 신·의약 원료의 개발과 생리기능성 물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 원료 물질에는 기본적으로 육상생물이 많은 비중을 차지하였으나, 최근에는 해양생물에 대한 관심이 집중되고 있다. 해양생물종은 지구 전체 생물종의 약 80%를 차지하고 있으며, 육상생물과는 다른 진화과정의 독자성과 서식환경의 특이성으로 생리활성 물질과 신종 효소 등을 보유하여 고부가가치 상품으로서의 활용도와 소비 수요가 더욱 높아지고 있어 새로운 유용물질의 개발가능성이 높은 것으로 기대된다.

해조류는 천연 소재로서 자연 친화적이며, 특히 다양한 다당류를 함유하고 있을 뿐만 아니라 풍부한 무기질과 비타민이 함유되어 있다[10]. 해조류의 특성 성분에서는 항균, 항산화, 항고혈압 및 항암, 항바이러스 활성을 비롯하여 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 협심증, 뇌졸중 등의 성인병 예방에도 효과적인 것으로 알려져 있다[16].

매생이(*Capsosiphon fulvescens*)는 갈파래목 갈파래과 매생

이속에 속하는 녹조식물로서 우리나라 해안의 청정지역에서 널리 분포하며 단백질과 아미노산 및 다당류가 많이 포함되어 있다[11,12]. 매생이는 다른 해조류에 비해서 보다 높은 가격 경쟁력을 가지고 있기 때문에 매생이에 대한 연구는 종의 분류학적 기재 및 번식, 생태 및 생활사, 분포, 형태 및 분류, 인공채묘 등 생물학적인 기초 재배적인 연구가 많이 수행되어 있다[12].

해조류 유래 기능성 신소재 연구에서는 주로 열수 추출법과 알코올 추출법 등의 추출법들을 사용하여 생리활성 연구를 수행하여 왔는데, 매생이에 대한 생리활성 연구는 Park 등[19]이 간 독성을 유발한 흰쥐의 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에서 매생이 추출물이 지질과산화의 생성을 감소시키고 xanthine oxidase 활성을 억제한다고 보고하였다. 뿐만 아니라, Kim 등[13]은 최근에 매생이 당단백질의 위암세포사멸기전에 대해서, Yu [26]는 매생이의 펠라닌 생성 억제 효과에 관한 연구를 하였으며, Han [7]과 Lee 등[15]은 매생이 추출물의 경구투여로 고콜레스테롤혈증의 예방과 지방축적 억제효과가 있다고 보고하였다. 또한, 매생이의 수용성 다당류가 항암 및 면역력을 촉진한다는 연구가 최근에 보고되고 있다[14,17,18].

본 연구에는 고부가가치 해조류 유래 기능성 신소재 연구를 위해서 해조류로부터 다당류를 효과적으로 추출할 수 있는 효소추출법[8]을 이용하여 비소화성 해조 다당류의 저분자화를 통하여 해조 다당류의 생리활성을 분석하고자 하였다. 특히, 기존의 효소추출법과는 달리 비소화성 복합다당류 분해능

[†]These authors have contributed equally to this work.

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-6959

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

이 우수한 해양미생물을 이용하여 매생이 효소추출에 이용하였으며, 매생이 효소분해산물의 기능성 효과를 검증하여 새로운 천연물 소재 개발을 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

매생이(*C. fulvescens*)는 전남 장흥산을 냉동상태의 생체로 구입하여 깨끗이 씻은 후 일주일 동안 음지에서 자연 건조시켰다. 매생이를 분쇄한 후 30 mesh 이하의 것을 효소추출용 시료로 사용하였으며 매생이 효소분해산물은 해양미생물 *Microbulbifer* sp. AJ-3 [24]에 의해 추출되었다.

조효소 조제 및 기질 특이성조사

조효소의 조제를 위한 균주 배양은 0.35 g agar를 함유한 Marin broth (Difco, 37.4 g/l) 배지에서 37°C에서 3일 배양한 후 배양액을 30% ammonium sulfate로 포화시켜 4°C에서 24시간 방치시킨 다음 원심분리(8,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 상등액을 다시 70% ammonium sulfate로 포화시켜 4°C에서 방치시킨 후 원심분리(10,000 rpm, 30 min, 4°C)한 다음 침전물을 TE buffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 투석하였다. 투석된 조효소는 동결 건조시켜 매생이 분말의 분해를 위한 조효소로 사용하였으며 단백질 정량은 Bradford 방법으로 protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하여 spectrophotometer로 595 nm의 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다. 효소의 기질 특이성 조사를 위해 TE buffer에 agar, agarose, alginic acid, fucoidan, laminaran, starch, chitin을 각각 1%(w/v) 첨가하여 각 기질에 대한 효소 활성을 측정하였다.

매생이 효소분해산물 조제

매생이 효소분해산물 조제는 매생이 분말(0.5%)과 조효소를 혼합하여 섞어 37°C에서 반응시킨 다음 원심분리한 후 상등액은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법으로 생성된 galactose 함량을 spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준곡선은 galactose를 이용하여 작성하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

매생이 효소분해산물의 전자공여능은 Blois의 방법[1]에 따라 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. DPPH 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 1.5×10^{-4} M을 녹인 후 증류수와 혼합하여 Whatman filter paper No. 2로 여과하여 조제하였다. 96 well plate에 시료와 DPPH 용액을 1:4 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 520 nm (Molecular Device,

VersaMax Microplate Reader, California, USA)에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었으며 EDA (%)=(대조구 흡광도-시료첨가구 흡광도)/대조구 흡광도×100으로 계산하였다.

SOD 활성 측정

SOD 활성은 SOD Assay Kit (Dojindo Molecular Technologies, USA)를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 샘플을 넣은 후, 각 well에 효소를 20 µl씩 넣어 활성산소를 억제시킨다. 대조구 실험은 효소 대신 20 µl dilution buffer를 넣었으며, SOD 효소활성 측정은 ELISA reader를 사용하여 450 nm 흡광도에서 측정하였다. SOD 활성은 시료첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율 (%)로 나타내었으며, SODA (%)=(1-시료첨가구 흡광도/시료무첨가구 흡광도)×100으로 계산하였다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Gray 등의 방법[6]을 변형하여 측정하였다. 아질산염 용액에 시료 용액 1 ml을 가하고 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2) 및 0.2 M 구연산 완충용액(pH 3.0과 6.0)을 사용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정하였다. 반응용액을 37°C에서 1시간동안 반응시킨 다음 Griess 시약을 가하여 혼합한 후 15분간 실온에 방치시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 아질산염 소거능을 측정하였다. 대조구 시험은 Griess 시약 대신 증류수를 가하여 상기와 동일하게 수행하였다. 아질산염 소거율(%)=[1-(실험첨가구의 흡광도-실험무첨가구의 흡광도)/대조구의 흡광도]×100으로 계산하였다.

ADH 활성 영향 측정

ADH 활성도는 Choi 등[5]과 Racker [22]의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응용액은 NAD 300 µl, 증류수 1.4 ml, 1 M Tris-HCl (pH 8.8) buffer 750 µl, 0.2 M 에탄올 300 µl, 시료 100 µl, 효소액 150 µl를 넣고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 NADH의 양을 spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 TE buffer를 사용하였으며 positive control로 사용한 hepos는 약국에서 구입한 것으로 처방전에 따라 1/2로 희석하여 사용하였다. ADH의 활성은 반응 종료 시의 최대 흡광도를 대조구의 최대 흡광도에 대한 비율로 나타내었다. ADH activity (%)=실험구의 최대 흡광도/대조구의 최대 흡광도×100으로 계산하였다.

Tyrosinase 저해 활성

매생이 효소분해산물의 tyrosinase 활성 저해능 측정은

Yagi의 방법[25]에 따라 측정하였다. 반응용액은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 10 μ l, 기질(2 mM L-tyrosine solution) 10 μ l 및 시료 혼합용액 10 μ l에 mushroom tyrosinase (1,000 unit/ml) 20 μ l, Degassed 증류수 9 μ l를 첨가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도 값 (SABs)을 측정하였다. 이때 효소액 대신에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 20 μ l를 첨가하여 흡광도를 측정한 값 (BABs), 시료 용액 대신에 증류수 10 μ l를 첨가하여 흡광도 값을 측정하였다. 저해율 (%)=[1-(실험첨가구의 흡광도-실험무첨가구의 흡광도)/대조구의 흡광도] \times 100으로 계산하였다.

결과 및 고찰

효소의 기질특이성

해양미생물로부터 추출된 효소들은 해조류의 세포벽에 있는 섬유질이나 당단백질 혹은 알긴산 고분자 물질 등을 분해시키는 작용을 하여 활성물질들이 원활히 추출될 수 있도록 유도해 주는 작용을 한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 agar 분해능이 높은 해양미생물 *Microbulbifer* sp. AJ-3 균주[24]로부터 조효소를 분리하여 해조류에 많이 존재하는 복합다당류 (agar, alginic acid, fucoidan, laminaran, starch, chitin)와 반응시켜 기질 분해능을 조사하였다(Fig. 1).

복합다당류에 대한 분해능은 agar에 대한 상대적인 활성으로 나타내면 chitin 34.8%, fucoidan 36.8%로 비교적 낮은 활성을 보였고, starch 51.2%, agarose와 laminaran은 agar와 비슷한 수준인 115.6%, 103.1%의 활성을 나타내었다. 이와 동시에 alginic acid에 대해서는 agar의 2배가 넘는 239.3%의 활성을 나타내고 있어 *Microbulbifer* sp. AJ-3 균주로부터의 agarase와 alginate lyase 활성이 높은 것으로 나타났다. Jonnadula 등[11]

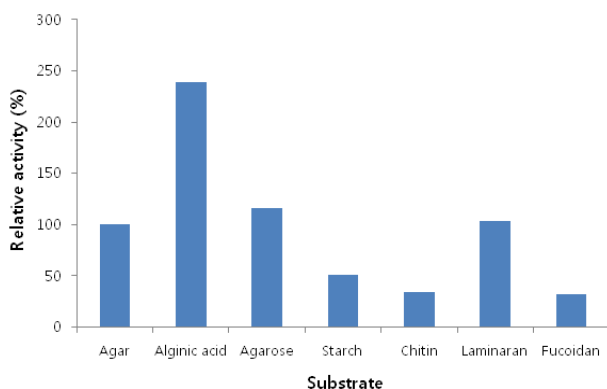


Fig. 1. Substrate specificity of extracellular enzyme from *Microbulbifer* sp. AJ-3 on various polysaccharides. The enzyme activity was obtained from a calibration curve prepared following the same procedure with D-galactose as the standard. The enzyme activities were measured by each 1% substrate (w/v).

은 해조류로부터 분리된 *Microbulbifer* CMC-5 균주가 해조류에 많이 존재하는 비소화성 복합다당류인 agar, alginate, carboxymethyl cellulose, carrageenan, xylan, chitin등을 분해하는 것으로 보고하였다.

DPPH 라디칼 소거능

Free radical은 생체 내에서 노화와 질병을 유발하는 활성산소종을 생성하게 되며, 이러한 활성산소종은 각종 성인병과 노화, 피부 면역 기능을 억제시켜 염증을 유발시키고, 탄력감소, 주름살 및 기미, 주근깨 등의 피부노화를 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 최근 인체 내의 free radical을 제거할 수 있는 천연 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능 측정법이 천연 항산화제의 free radical 소거 활성을 측정하는데 주로 사용되고 있다.

본 연구에서는 *Microbulbifer* sp. AJ-3를 이용하여 조제한 매생이 효소분해산물의 항산화 활성을 Fig. 2에 나타내었다. 매생이 효소분해산물의 항산화 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며 2 mg/ml에서 32%의 항산화활성을 나타내었다.

Jeong과 Lee [10]는 매생이 에탄올 추출물에서 페놀 함량과 항산화 활성을 연구하였는데 항산화 활성이 낮은 것으로 나타났으며 우리의 선행연구에서도 10 mg/ml 농도의 매생이 열수추출물에서 10.8%의 DPPH 라디칼 소거능을 보고하였다 [3]. Seo 등[23]은 홍조류 메탄올 추출물에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을, 다음으로 갈조류 추출물에서 63%, 녹조류의 DPPH 라디칼 소거능은 19%로 활성이 낮게 나타났다. 본 연구에서 매생이 추출물보다 효소분해산물의 DPPH radical 소거능이 더 높게 나타나고 있는 데 이러한 이유는 비소화성 다당류의 저분자화로 항산화 활성이 높게 나타난 것으로 판단되며, 따라서 효소추출법이 새로운 해조류 추출법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

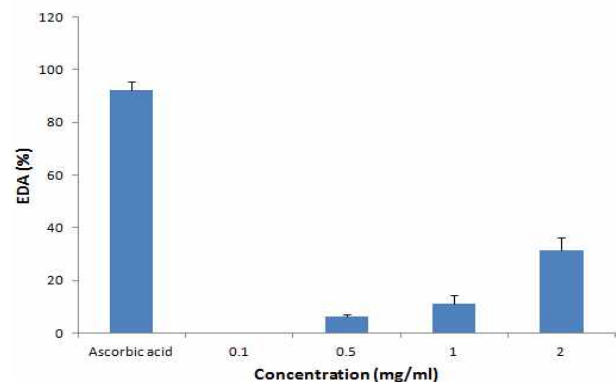


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of enzymatic products from *Capsosiphon fulvescens* using *Microbulbifer* sp. AJ-3. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Ascorbic acid (0.1 mg/ml) is used as positive control.

SOD 활성

모든 생물체는 미토콘드리아에서 일어나는 호기성대사 과정에서 활성산소를 생성하게 되는데 적정량의 활성산소는 생체면역기능에 관여하지만 그 양이 많으면 활성산소종이 DNA 및 세포막 손상 등을 유발한다. 따라서 생물체는 이러한 활성산소를 제거하기 위하여 항산화효소들을 가지고 있다. Superoxide dismutase (SOD)는 superoxide (O₂⁻)를 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하고 다시 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다.

지금까지의 해조류에 대한 SOD 활성은 주로 용매추출물에 대한 결과로 이러한 실험의 문제점은 수율이 낮고, 추출시 고온을 이용하기 때문에 열에 불안정한 항산화 물질이 파괴되었을 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다[8].

매생이로부터 효소분해산물을 추출하여 SOD 유사활성을 분석한 결과는 Fig. 3에 나타나있다. 매생이 효소분해산물 2 mg/ml의 농도에서 93%의 활성을 보였는데 이는 positive control로 사용한 ascorbic acid (0.5 mg/ml)와 유사한 활성을 나타냈다. 저자들의 선행연구에서 매생이 열수추출물 SOD 유사활성은 1 mg/ml에서 2.6%, 에탄올추출물 1 mg/ml에서는 1.7%로 아주 낮은 것으로 나타났으며 매생이 효소분해산물에 대한 SOD 활성은 거의 보고된 연구가 없는 것으로 사료된다.

이러한 결과는 기존의 해조류 추출법인 열수추출법과 에탄올추출법보다는 효소추출법으로 추출된 매생이 효소분해산물의 SOD 활성이 높은 것으로 판단된다.

아질산염 소거능

발암물질로 알려진 nitrosamine의 전구체인 아질산염은 미량이기에는 하나 채소, 곡류 등 각종 농산물에 널리 함유되어 있고, 육제품이나 기타식품의 보존과 발색안정성을 위해 식품첨가물로도 사용된다. 이러한 아질산염은 아민류를 함유하고 있는 음식물과 동시에 섭취 하였을 때 동물이나 인체의 위 내에서 반응하여 발암성 물질인 nitrosamine을 생성하게 되며 pH가 낮은 환경에서 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있다 [20,21].

매생이 효소분해산물에 대한 아질산염 소거능에 대한 실험 결과가 Fig. 4에 나타나 있다. 매생이 효소분해산물 1 mg/ml 농도에서 아질산염 소거능이 pH 1.2에서 82%, pH 3.0에서 53%, pH 6.0에서 12%를 나타내었다. 이를 positive control인 ascorbic acid (1 mg/ml)에 대한 아질산염 소거능과 비교한 결과 pH 1.2에서 85%, pH 3.0에서 49%, pH 6.0에서 10%로 같은 농도의 매생이 효소분해산물과 유사한 활성을 보였다.

Park [20]은 해조류의 메탄올추출물의 아질산염 소거능은 대부분 갈조류의 경우 높게 나타났으며, 녹조류나 홍조류는 갈조류에 비해 현저히 낮은 것으로 보고하였다. Park 등[18]은 매생이의 열수추출물의 다당류에서 면역기능과 항암효과 있

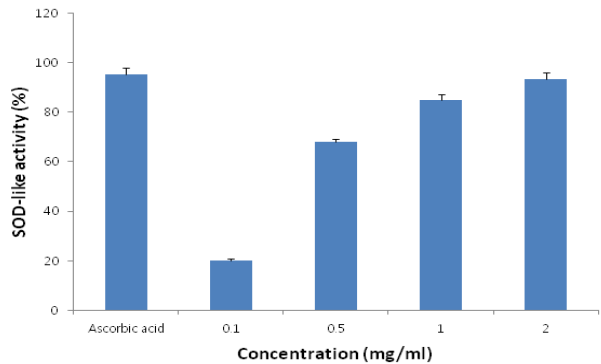


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD) like-activity of enzymatic products from *Capsosiphon fulvescens* using *Microbulbifer* sp. AJ-3. Results are mean±S.D. of triplicate data. Ascorbic acid (0.5 mg/ml) is used as positive control.

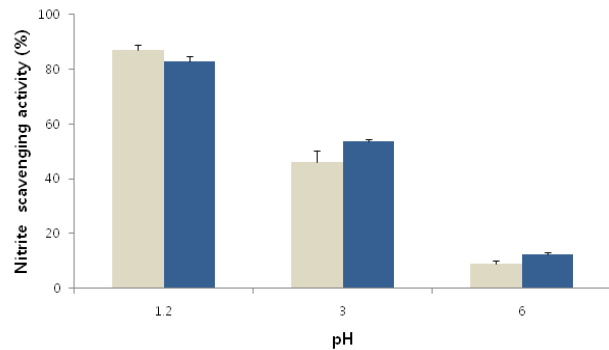


Fig. 4. Nitrite scavenging ability of enzymatic products (black bar) of *Capsosiphon fulvescens* using *Microbulbifer* sp. AJ-3 at different pH (1.2, 3.0, 6.0). Results are mean±S.D. of triplicate data. Ascorbic acid (1 mg/ml) (gray bar) is used as positive control.

는 것으로 보고하였다. 그런데 매생이 추출물에 대한 대부분의 항산화 실험에서 아질산염의 소거능에 대한 실험결과가 보고된 것이 없는 것으로 보아 매생이의 아질산염 소거능은 없는 것으로 사료되며, 우리들의 선행연구에서도 아질산염 소거능은 거의 없는 것으로 나왔다(data not shown). 이러한 결과는 매생이의 효소분해산물의 경우 항산화 활성이 높은 ascorbic acid와 같은 농도에서 유사한 아질산염 소거능을 나타내고 있어 매생이의 기능성을 활용한 신소재 개발을 위해서는 용매추출법보다는 우리들이 선별한 해양미생물이 생산하는 효소를 활용하여 다양한 해조류 추출에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

ADH 활성

체내로 흡수된 알코올의 대부분은 위장과 소장에서 흡수되어 간으로 이동된 후 분해되는데 체내에 들어온 알코올은 간세포에 존재하는 alcohol dehydrogenase (ADH)에 의해 acetaldehyde로 분해된다[2]. 이와 같이 ADH는 체내 알콜

대사의 1차 관여 효소로서 혈중 알코올 수치를 빠른 속도로 감소시켜 숙취 해소에 간접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

ADH 효소활성에 미치는 매생이 효소분해산물의 영향에 대한 실험결과는 Fig. 5에 나타나 있다. 매생이 효소분해산물에 대한 ADH 활성은 모든 실험구에서 유의적인 차이를 나타냈으며 대조구의 흡광도의 값을 100으로 하였을 때 매생이 효소분해산물을 첨가한 경우 농도 의존적으로 ADH 활성이 증가하였다. 매생이 효소분해산물 2 mg/ml 농도의 ADH 활성은 30%로 나타났다. Positive control로 현재 시판되고 있는 숙취 해소제 hepos의 ADH 활성은 72%로 높게 나타났다. 저자들의 선행연구에서 매생이 열수추출물의 ADH 활성은 10 mg/ml에서는 9.1%로 활성이 낮았으며, 80% 에탄올 추출물의 ADH 활성은 10 mg/ml에서는 13.3%로 나타났으며, 매생이 열수와 에탄올 추출물의 ALDH 활성에는 전혀 영향을 미치지 않았다[3].

Kim 등[12]은 알콜 분해와 숙취에 효과가 있는 것으로 알려진 헛개나무 추출물이 알코올 분해효소(ADH)와 알데히드 분해효소(ALDH)활성을 측정하였는데 헛개나무 추출물의 농도 10, 30, 60 및 100% (v/v)에서 상대적인 활성증가가 각각 4.4, 14.4, 25.0 및 46.6%로 추출물의 농도가 증가할수록 증가하는 것으로 보고하였다. 이에 비해서 매생이는 숙취해소에 효과가 있는 것으로 많이 섭취하고 있지만 매생이 추출물의 알코올 분해효소에 대한 저자들의 선행연구와 매생이 효소분해산물의 알코올 분해효소에 대한 연구결과 매생이가 ADH 활성에는 영향을 미치지 않지만 숙취해소 원인물질인 아세트알데히드 산화에는 큰 효과가 없는 것으로 나타났다(data not shown). Hwang 등[9]은 녹조류인 매생이에 존재하는 polysaccharides가 알코올 섭취로 인해 발생하는 위장질환이나 면역기능 효과가 있는 것으로 보고하고 있지만 매생이의 숙취해소에 효과에 대한 연구결과는 거의 없어 앞으로 이에 대한 연구가 요구된다.

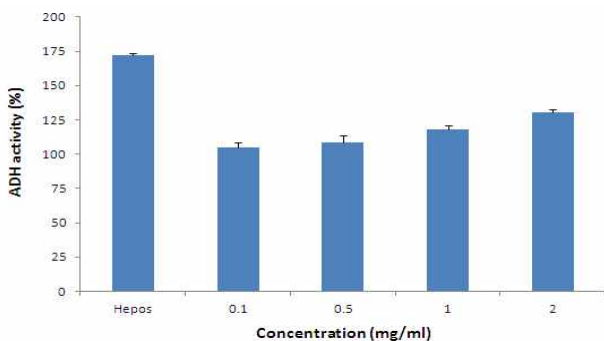


Fig. 5. Alcohol dehydrogenase (ADH) activity of enzymatic products from *Capsosiphon fulvescens* using *Microbulbifer* sp. AJ-3. Results are mean±S.D. of triplicate data. Hepos is used as positive control.

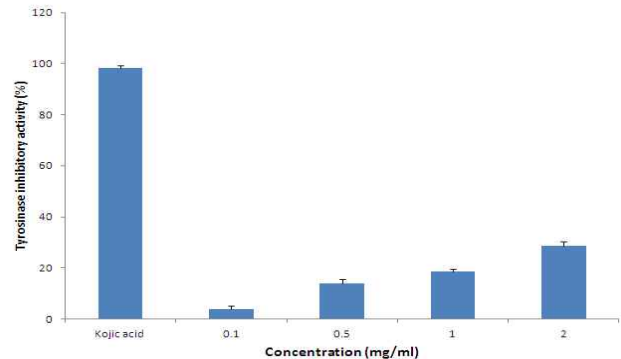


Fig. 6. Tyrosinase inhibitory effect of enzymatic products from *Capsosiphon fulvescens* using *Microbulbifer* sp. AJ-3. Results are mean±S.D. of triplicate data. Kojic acid (1 mg/ml) is used as positive control.

Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 멜라닌 합성의 초기단계인 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 L-dopa-quinone으로 전환에 관여하며 최종적으로 melanin 색소생성에 관여하는 효소이다. 특히 피부는 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 멜라닌이 형성되어 피부노화가 촉진되며, 색소침착과 피부 흑화 현상의 원인이 된다. 따라서 tyrosinase 활성저해제는 의약품, 화장품 등에 널리 적용되며, 인체에 부작용이 적은 천연소재를 확보하기 위한 연구가 집중되고 있다[13]. 잘 알려진 tyrosinase 활성저해제로는 aromatic aldehyde, aromatic acids, tropolone 및 kojic acid가 있다.

Melanin 색소 생성에 관여하는 tyrosinase에 대한 *Microbulbifer* sp. AJ-3를 이용하여 만든 매생이 효소분해산물의 농도별 저해효과를 Fig. 6에 나타내었다. 매생이 효소분해산물 2 mg/ml에서 28%의 저해활성 나타냈으며, positive control인 kojic acid (1 mg/ml)에서 98%의 활성에 비해 상당히 낮은 활성을 보이나 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. Seo [23]의 연구에 의하면 녹조류인 떡청각과 잎파래의 추출물이 24%, 36%의 활성을 보였으며 갈조류인 모자반과 툯에서는 21%, 52% 정도 tyrosinase 저해 활성이 나타났고, Choi 등[4]의 보고에는 해조류의 메탄올 추출물 중에서 납작파래가 53%의 저해효과를 나타냈으며 매생이는 21%의 활성을 보였다. 따라서 매생이 효소분해산물의 tyrosinase 저해활성은 다른 해조류와 비슷한 수준임을 알 수 있었다.

따라서 본 연구의 결과는 해양미생물 *Microbulbifer* sp. AJ-3에 의해서 생산되는 효소를 활용하여 다양한 해조류 추출에 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 앞으로 매생이 효소분해산물에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단에서 주관하는

지역혁신인력양성사업으로부터 지원을 받아 연구되었습니다.

References

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1198-1200.
- Cha, W. S., Shin, H. R., Park, J. H., Oh, S. L., Lee, W. Y., Chun, S. S., Choo, J. W. and Cho, Y. J. 2004. Antioxidant activity of phenol compounds from mulberry fruits. *Kor. J. Food Preserv.* **11**, 383-387.
- Cho, E. K., Yoo, S. K., and Choi, Y. J. 2011. Inhibitory effect of Maesaengi (*Capsosiphon fulvescens*) extracts on angiotensin converting enzyme and α -glucosidase. *J. Life Sci.* **21**, 811-818.
- Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, Y. S. and Lee, N. H. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 237-242.
- Choi, J. T., Joo, H. K. and Lee, S. K. 1995. The effect of Schizandrae fructus extract on alcohol fermentation and enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**, 278-282.
- Gray, J. I. and Dugan Jr, L. R. 1975. Inhibition of N-Nitrosamine formation in model food system. *J. Food Sci.* **40**, 981-984.
- Han, H. A. 2002. A study of flavor on *Capsosiphon fulvescens*. MS thesis. Yosu University.
- Heo, S. J. and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Ind. Nutr.* **10**, 31-41.
- Hwang, H.-J., Kwon, M.-J., Kim, I.-H. and Nam, T.-J. 2008. The effect of polysaccharide extracted from the marine alga *Capsosiphon fulvescens* on ethanol administration. *Food Chemical Toxicol.* **46**, 2653-2657.
- Jeong, K. S. and Lee, N. G. 2010. A study on physiological activity and antioxidative activity of Maesangi (*Capsosiphon fulvescens*) extract. *J. Environmental Sci.* **19**, 407-414.
- Jonnadula, R. and Ghadi, S. C. 2011. Purification and characterization of agarase from seaweed decomposing bacterium *Microbulbifer* sp. strain CMC-5. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **16**, 513-519.
- Jung, K. J., Jung, C. H., Pyeun, J. H. and Choi, Y. J. 2005. Changes of food components in Mesangi (*Capsosiphon fulvescens*), Gashiparae (*Enteromorpha prolifera*), and Cheonggak (*Codium fragile*) depending on harvest times. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 687-693.
- Kim, S.-M., Kang, S.-H., Ma, J. Y. and Kim, J.-H. 2006. A study on the extract and efficacy of bioactive compound from *Hovenia dulcis*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 11-15.
- Kim, Y.-M., Kim, I.-H. and Nam, T.-J. 2011. Induction of apoptosis signaling by a glycoprotein of *Capsosiphon fulvescens* in AGS cell. *Kor. J. Fish Sci.* **44**, 216-224.
- Lee, J. H., Lee, Y. M., Lee, J. J. and Lee, M. Y. 2006. Effects of *Capsosiphon fulvescens* extract on lipid metabolism on rat fed high cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 402-409.
- Lee, S. H., Kim, K. N., Cha, S. H., Ahn, G. N. and Jeon, Y. J. 2006. Comparison of antioxidant activities of enzymatic and methanolic extracts from *Ecklonia cava* stem and leave. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1139-1145.
- Na, Y. S., Kim, W. J., Kim, S. M., Park, J. K., Lee, S. M., Kim, S. O., Synytsya, A. and Park, Y. I. 2010. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *Intl. Immunopharmacol.* **10**, 364-370.
- Park, H.-Y., Lim, C.-W., Kim, Y.-K., Yoon, H.-D. and Lee, K.-J. 2006. Immunostimulating and anticancer activities of hot water extract from *Capsosiphon fulvescens*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 343-348.
- Park, J. C., Choi, J. S., Song, S. H., Choi, M. R., Kim, K. Y. and Choi, J. W. 1997. Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**, 239-246.
- Park, Y. B. 2005. Determination of nitrite-scavenging activity of seaweed. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1293-1396.
- Park, Y. B., Lee, T. G., Kim, O. K., Do, J. R., Yeo, S. G., Park, Y. H., and Kim, S. B. 1995. Characteristics of nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* Ruprecht (Omija) seed. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 928-935.
- Racker, E. 1973. Alcohol dehydrogenase in rat liver. *Biochem J.* **135**, 577-581.
- Seo, Y. W. and Yoo, J. S. 2003. Screening for antioxidizing and tyrosinase-inhibitory activities of the extracts of marine algae from Busan coastal area. *Ocean Polar Res.* **25**, 129-132.
- Song, H. J. 2009. Molecular cloning and characterization of agarase gene from marine bacterium, *Microbulbifer* sp. AJ-3. MS Thesis. Silla University.
- Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom tyrosinase by aloe extract. *Planta Medica* **53**, 517-519.
- Yu, H. J. 2004. Inhibitory effect on the melanogenesis of ethanol extract of *Capsosiphon fulvescens*. PhD Thesis. Wonkwang University.

초록 : 해양미생물 *Microbulbifer* sp. AJ-3을 이용한 매생이 효소분해산물의 생리활성 연구

배정미[†] · 조은경[†] · 김혜운 · 강수희 · 최영주*

(신라대학교 식품영양학과)

본 연구에서는 해수로부터 난소화성 복합다당류를 분해하는 해양미생물 *Microbulbifer* sp. AJ-3의 효소에 대한 기질 특이성을 분석하고 균주가 생산하는 효소를 이용하여 매생이의 효소분해산물을 조제하여 이에대한 생리활성을 분석하였다. 효소의 활성은 agar에 대한 상대적인 활성으로 나타내었는데 chitin 34.8%, fucoidan 36.8%로 비교적 낮은 활성을 보였고, starch 51.2%, agarose와 laminaran은 agar와 비슷한 수준인 115.6%, 103.1%의 활성을 나타내었다. 이 뿐만 아니라 alginic acid에 대해서는 agar의 2배가 넘는 239.3%의 활성을 나타내었다. 매생이 효소분해산물의 항산화능은 DPPH radical 소거능과 SOD 활성측정으로 분석하였는데 매생이 효소분해산물 2 mg/ml의 농도에서 DPPH 라디칼 소거능은 32%, SOD 활성은 93%로 나타났다. 매생이 효소분해산물의 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 82%, pH 3.0에서 53%, pH 6.0에서 12%로 positive control인 비타민C와 유사한 활성을 보였다. 매생이 효소분해산물의 숙취해소 효능은 ADH 활성증진에 미치는 영향을 조사하였는데 효소분해산물 2 mg/ml 농도에서 30%의 증가된 알콜 분해능이 나타났다. 매생이 효소분해산물의 미백 효능에 대해서는 tyrosinase 저해능으로 분석하였으며 2 mg/ml에서 28%의 저해활성을 나타내었고 농도가 증가함에 따라 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다.