

α -Glucosidase, Tyrosinase, and Elastase Inhibitory Effects of Enzymatic Extracts from *Ecklonia cava* and its Alcohol Metabolizing Activity

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

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

Received February 27, 2012 / Revised May 30, 2012 / Accepted May 30 2012

Microbulbifer sp. was used to acquire the degrading products from *Ecklonia cava* (DPEC) and the products were investigated to determine the physiological activities. Firstly, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) activity and superoxide dismutase (SOD) assay were about 84.1% and 89.6% at 2.5 mg/ml, respectively. In addition, nitrite scavenging ability was shown to be 56.3% at 0.5 mg/ml on pH 1.2. α -Glucosidase inhibitory activity was increased in a dose-dependent manner and was about 58.7% at 2.5 mg/ml. To determine the influence of DPEC on alcohol metabolism, the generating activity of reduced-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) were measured. Facilitating rates of ADH and ALDH activities by DPEC were 123.3% and 215.2% at 2.5 mg/ml, respectively. For analyses of anti-wrinkling and whitening effects, its elastase and tyrosinase inhibitory activities were measured and were about 73.1% and 42.2% at 2.5 mg/ml, respectively. These results indicated that DPEC has valuable biological attributes owing to its antioxidant, nitrite scavenging, and alcohol metabolizing activities and α -glucosidase, elastase, and tyrosinase inhibitory activities.

Key words : *Microbulbifer* sp., *Ecklonia cava*, physiological activities, elastase, tyrosinase

서 론

최근 급격한 생활환경의 변화와 서구화된 식생활로 인해 성인병과 암, 노화등이 증가되고 있는데 이를 예방하기 위해 안전성이 입증된 식물체 추출성분에 대한 연구가 이루어져 왔다. 하지만, 이러한 연구는 대부분 육상 식물을 대상으로 한 것으로 이미 한계치에 이르고 있으므로 새로운 건강기능성 소재개발을 위해서는 해조류에 대한 연구가 필요하다. 이는 해조류가 극심한 환경에서 생육하므로 육상식물과는 다른 성분과 생리활성이 있을 것으로 추측되기 때문인데 해조류 중의 하나인 감태의 경우도 항산화, 항암, 항고혈압, 미용효능, 숙취 해소등과 같은 다양한 기능성들이 밝혀지면서 새로운 고부가 가치 식품 소재로서 충분한 가치가 있는 것으로 보고되고 있다[7,14,24]. 하지만, 이러한 연구들은 열수 및 유기용매 추출에 의한 감태의 기능성 입증으로 그 이용가치에 대한 효율적인 면이 의심되고 있는데 해조류의 세포벽에 있는 섬유질이나 당단백질 등의 고분자 물질을 분해시켜 생리활성물질이 원활히 추출될 수 있도록 하기 위해선 효소 추출법이 최적이기 때문이다. 효소 추출법은 열수 추출법이나 기타 추출법에 비하여 높은 수율의 저분자 수용화 기술이어서 효소 추출물이 가지고 있는 생리 활성을 생체 내로 쉽게 전달 시킬 수 있고,

유기용매와 같은 화학약품을 사용하지 않아 안전성에 대한 우려도 없어 기능성 천연소재로서 식품의 응용성이 매우 높을 것으로 기대된다[11,12].

이에 본 연구에서는 지금까지 보고된 감태에 대한 열수 추출물이나 유기용매 추출물의 생리활성에 대한 연구와는 달리 해조류의 비산화성 복합 다당류를 분해할 수 있는 해양 미생물을 이용하여 감태에 효소를 처리 후 추출한 감태 효소분해 산물의 항산화능, 항염증, 항당뇨, 알코올 분해능, cosmetic 기능 등의 생리활성을 측정하여 감태의 천연 기능성 소재로서의 개발 가능성을 새로운 추출법을 활용하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 감태(*E. cava* Kjellman)는 제주 해초식품에서 구입하여 깨끗이 세척 후 일주일 동안 음지에서 자연 건조 시킨 후 믹서기(HMF-1000A, Hanil Electronics, Korea)로 분쇄한 다음 150 μ m 체에 걸러내어 효소 추출을 위한 시료로 사용하였다.

균주의 분리 및 동정

해양으로부터 해조류의 난산화성 복합다당류를 분해하는 균주를 분리하기 위해 가장 해안의 해수를 시료로 하여 1.5% agar가 포함된 marine broth (MB, Difco) 배지에 배양하였다. 배양 후, agar plate 표면에 colony를 중심으로 움푹 파이거나

[†] 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

clear zone 형성하는 것을 선정하였으며, 순수 분리한 이 균주를 SC092로 명명하고 16S rDNA sequence를 이용하여 동정 후 RDF program (<http://rdp.cme.msu.edu>)을 통해 종의 유사성이 매우 가까운 것으로 분석하였다. 16S rDNA sequencing을 위해 사용된 프라이머는 F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 였고 R: 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'였다.

균주의 조효소 조제

조효소 생산은 SC092 균주를 최적 조건으로 전배양한 다음, 0.3% agar가 포함된 MB 배지 250 ml에 0.1%로 첨가한 후 37°C, 72시간 진탕배양(200 rpm) 하였다. 배양액을 6,000×g에서 30분 동안 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 조효소액으로 하였다. 조효소액은 30% ammonium sulfate로 포화시킨 후 4°C에서 24시간 침전하였다. 침전물은 8,000×g에서 30분 동안 원심분리한 후 상등액을 다시 70% ammonium sulfate로 포화시켜 4°C에서 24시간 침전한 다음 10,000×g에서 30분 동안 원심분리한 다음 침전물을 TE buffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 후 투석하였다(cut-off value, 12,000-14,000 MW). 조효소의 함량은 Bradford의 방법 [4]에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준단백질로 BSA (Bovine Serum Albumin)를 사용하였다.

조효소 활성 측정

조효소 활성 측정은 TE buffer에 1% Bacto-Agar를 첨가하여 조효소 작용에 의해 생성된 galactose 환원당을 DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) 법[27]에 따라 측정하였다. 효소반응은 기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 분광광도계를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분간 1 μmol의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였으며, 표준곡선은 galactose를 사용하여 작성하였다.

조효소의 기질 특이성 조사

조효소의 기질 특이성은 TE buffer에 다당류인 fucoidan, laminarin, alginic acid, starch, chitin 및 agar를 각각 1% (w/v)씩 첨가하여 조효소액과 반응시킨 후 생성된 다당류를 정량하여 효소에 대한 기질의 특이성을 측정하였다.

감태 효소분해산물 제조

단백질의 함량이 1.7 mg/ml인 조효소액 8 ml에 0.5% 감태 분말을 첨가하여 37°C water bath에서 48시간 동안 반응시켰다. 감태 효소분해산물의 생성량은 효소에 의해 생성된 galactose 환원당의 양을 DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) 법 [27]에 따라 측정하여 최적 감태분해 조건을 조사하였다. 생성된 감태 효소분해산물은 원심분리하여 상등액을 농축한 후 동결건조시켜 -70°C에 보관하면서 생리활성 측정을 위한 시료

로 사용하였다.

DPPH radical 소거능 측정

감태 효소분해산물의 전자공여능은 Blois의 방법[3]에 따라 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. DPPH 용액은 100 ml 에탄올에 DPPH 1.5×10⁻⁴ M을 녹인 후 증류수 100 ml과 혼합하여 Whatman filter paper No. 2로 여과하여 조제하였다. 96 well plate에 시료와 DPPH 용액을 1:4 비율로 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, ELISA reader (Molecular Device, Versa Max Microplate Reader, California, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 EDA (%)=(대조구흡광도-시료첨가구흡광도)/대조구흡광도×100으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조 그룹과 흡광도차를 비교하여 free radical의 제거 활성을 백분율로 나타내었다.

SOD 활성 측정

감태 효소분해산물의 SOD (superoxide dismutase) 활성은 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, USA)를 사용하였으며, 흡광도 측정은 ELISA reader를 이용하였다. 먼저 시료를 농도별로 희석하여 96 well plate에 20 μl씩 분주한 후, WST working solution을 200 μl를 넣고 섞어주었다. 이 후, enzyme working solution을 20 μl를 넣고 37°C에서 20분간 incubation 한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, SOD 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD activity (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도

B: 시료 무첨가구의 흡광도

α-Glucosidase 활성억제 효과 측정

감태 효소분해산물의 α-glucosidase 활성억제 효과는 Tibbot의 방법[33]에 따라 측정하였다. 기질 용액은 50 mM sodium succinate buffer (pH 4.2)에 p-nitrophenol-α-D-glucopyranoside (PNPG, Sigma)를 용해시켜 1 mg/ml의 농도로 기질을 만들고, 기질용액 0.2 ml과 효소액(Sigma) 0.075 unit/ml를 혼합하여 대조구는 0.1 ml TE buffer (pH 8.0), 반응구는 시료 0.1 ml을 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1 N NaOH 0.1 ml를 첨가하여 발색시켰다. Positive control로는 acarbose를 사용하여 실험하였다. α-Glucosidase 효소 활성측정은 생성된 p-nitrophenol (PNP) 양을 400 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 저해율을 산출하였다.

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (\text{반응구의 } \rho\text{-nitrophenol 생성량} / \text{대조구의 } \rho\text{-nitrophenol 생성량})] \times 100$$

아질산염 소거능 측정

감태 효소분해산물의 아질산염 소거능은 Gray와 Dugan의 방법[9]을 변형하여 측정하였다. 아질산염 소거능은 아질산염 용액에 시료 용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정하여 사용하였다. 반응물을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 Griess 시약을 가하여 15분간 실온에 방치시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염을 구하였다. 아질산염 소거능은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{아질산염 소거율(\%)} = [1 - (A - C) / B] \times 100$$

- A: 1 mM NaNO₂ 용액에 추출 시료를 첨가하여 1시간 반응 후의 흡광도
 B: NaNO₂ 용액의 흡광도
 C: 추출시료 자체의 흡광도

ADH 활성 측정

감태 효소분해산물의 ADH 활성 측정은 Bergmeyer의 방법[2]을 약간 변형하여 측정하였다. NADH 생성량은 spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 상대적 활성을 비교하였다. 반응액 조성은 증류수 1.4 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.75 ml, 20 mM NAD⁺ 0.3 ml, 0.2 M EtOH 0.3 ml, 시료 0.1 ml를 첨가한 후, 25°C 항온수조에서 10분간 반응시키고 ADH (5 unit/ml) 0.15 ml를 cuvette에 넣어 반응용액이 3 ml이 되도록 조절하여 25°C에서 5분간 preincubation 하고, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료대신 TE buffer (pH 8.0)를 첨가 한 것으로 상대 활성을 나타내었으며, positive control로 사용한 Hepos는 약국에서 구입하여 처방전에 따라 1/2로 희석하여 사용하였다. ADH의 활성은 반응 종료시 최대 흡광도를 대조구의 최대 흡광도에 대한 비율로 나타내었으며, 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{ADH activity} = (B/A) \times 100$$

- A: 대조구의 최대 흡광도
 B: 실험구의 최대 흡광도

ALDH 활성 측정

감태 효소분해산물의 ALDH 활성 측정은 Koivula 및 Koivusalo의 방법[23]을 약간 변형하여 측정하였다. ALDH 효소활성 측정은 acetaldehyde에서 acetate를 생성하는 효소로 NAD에서 NADH를 생성하는 원리를 이용하였다. 반응액의 조성은 증류수 2.1 ml, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.3 ml, 20 mM NAD⁺ 0.1 ml, 0.1 M acetaldehyde 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 ml, 0.33 M 2- mercaptoethanol 0.1 ml, 시료 0.1 ml를 혼합한 다음 25°C에서 10분간 반응시키고 ALDH (1 unit/ml) 0.1 ml를 첨가 후, 반응용액이 3 ml이 되도록 조절하여 cuvette에

넣고 25°C에서 5분간 preincubation 하여 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 대조구는 시료대신 TE buffer (pH 8.0)를 첨가한 것으로 상대활성(%)을 나타내었고, positive control과 활성 계산식은 ADH 활성 측정식과 동일한 식을 사용하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

감태 효소분해산물의 tyrosinase 저해 활성은 Yagi 등의 방법[35]에 따라 측정하였다. 반응은 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 기질인 2 mM L-tyrosine solution 및 시료 용액의 혼합액을 mushroom tyrosinase (1,000 unit/ml) 효소와 degassed 증류수를 첨가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 다음 490 nm에서 흡광도 값(S_{Abs})을 측정하였다. 이 때, 효소액 대신에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 20 μl를 첨가하여 흡광도를 측정한 값(B_{Abs}), 시료 용액 대신에 TE buffer (pH 8.0)를 10 μl를 첨가하여 흡광도 값(C_{Abs})을 측정 한 후 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = [1 - (S_{Abs} - B_{Abs}) / C_{Abs}] \times 100$$

- S_{Abs}: Sample absorbance
 B_{Abs}: Blank absorbance
 C_{Abs}: Control absorbance

Elastase 저해활성 측정

감태 효소분해산물의 elastase 저해활성 측정은 James의 방법[13]에 따라 측정하였다. 피부노화, 특히 주름 생성에 있어 주된 역할을 하는 matrix metallo proteinases (MMPs)인 elastase의 저해활성 측정 방법은 다음과 같다. 효소반응은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2)에 기질인 0.5 mM N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroniline을 용해하여 시료 및 elastase (1 unit/ml) 효소용액을 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = [1 - S/C] \times 100$$

- S: 시료 첨가구의 흡광도
 C: 시료 무첨가구의 흡광도

통계분석

본 실험에서 얻은 결과는 각 시료마다 세 번씩 반복 실험을 통해 실험군당 평균과 표준편차를 계산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

기장 해안의 해수에서 분리한 해양 미생물은 agar plate 표면에 colony를 중심으로 오목해지거나 clear zone 형성되었고,

5일이 경과한 후 agar plate가 매우 유연해져 있음을 확인하였다. 이를 토대로, 이 미생물은 효과적인 agar 분해능이 있음을 알 수 있었고 그 중 활성이 높은 균주를 SC092라 명명하여 본 연구에 사용하였다. SC092는 16S rDNA sequence 분석으로 *Microbulbifer* sp.와 높은 유사성이 있었으며 이는 GenBank와 NCBI database의 alignment 결과에 기초하였다(Fig. 1). *Microbulbifer* sp.에 대한 보고에 의하면 Jonnadula 등[15]은 해조류로부터 분리된 *Microbulbifer* CMC-5 균주가 비소화성 복합다당류인 agar 등을 분해하는 것으로 보고하였고, Song [32]에 의하면 *Microbulbifer* sp. AJ-3 균주가 agar 및 agarose 분해능이 아주 높다고 하였다. 이는 본 연구결과인 *Microbulbifer* sp. SC092가 agar 분해능이 높게 나타날 수 있음을 뒷받침하고 있다.

조효소의 기질 특이성

해양미생물로부터 추출된 효소들은 해조류의 세포벽에 있는 섬유질이나 당단백질 혹은 알긴산 등과 같은 고분자 물질을 분해시켜 생리활성물질이 원활히 추출될 수 있도록 유도한다고 알려져 있을 뿐만 아니라 이에 대한 연구결과도 보고되어 있다[1]. 이에 본 연구에서는 agar 분해능이 높은 해양미생물 *Microbulbifer* sp. SC092로부터 조효소를 분리하여 해조류에 많이 존재하는 복합다당류인 fucoidan, laminarin, alginic acid, starch, chitin 및 agar의 분해 정도를 분석하고자 하였다. 복합다당류에 대한 조효소의 분해 정도는 agar에 대한 상대적인 활성으로 나타내었는데 fucoidan, laminarin, starch, chitin 기질에 대해서는 비교적 약한 분해능을 보였고 alginic acid는 146.2%의 높은 활성을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과로 *Microbulbifer* sp. SC092 균주의 조효소가 agar와 alginate 분해 활성이 높음을 알 수 있는데, 특히 감태는 다량의 alginate를 함유하고 있어[10] 본 연구에서 분석하고자 하는 감태의 효소적 분해산물의 생리활성 분석에 있어 *Microbulbifer* sp. SC092 균주의 조효소가 유용할 것으로 기대된다.

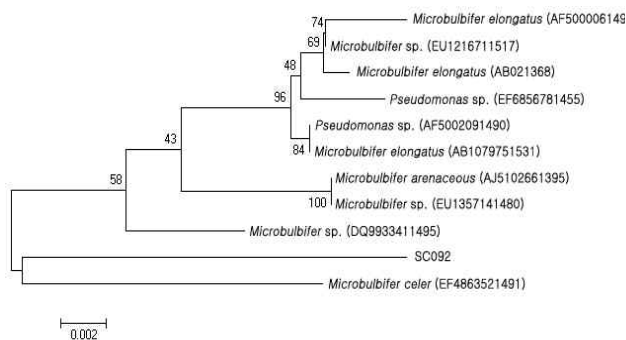


Fig. 1. Phylogenetic location of SC092 based on the partial 16S rDNA sequence. The phylogenetic tree was constructed based on the alignment of complete 16S rDNA sequences. The tree was created using the MEGA 4.1 program.

DPPH radical 소거능에 의한 항산화 활성

Free radical은 생물학적 손상의 주요 요인으로 잘 알려져 있으며, 이는 노화와 질병의 원인 중의 하나로 생체 내에서 활성 산소종을 생성하게 된다[34]. 인체 내의 free radical은 지질, 단백질 등과 반응하여 생체의 노화를 촉진할 수 있는 물질로 이러한 free radical을 제거할 수 있는 천연 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[26]. 특히, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거법은 항산화 물질의 전자 공여능을 이용한 항산화 측정법으로 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용되며, 천연 항산화제의 free radical 소거 활성을 평가하는데 일반적으로 사용된다[3].

감태 효소분해산물의 항산화 효과를 DPPH radical 제거 정도로 측정하는 전자공여능으로 나타낸 결과, 2.5 mg/ml 농도에서 84.1%의 항산화 활성을 나타내었다(Table 1). 이는 positive control로 사용한 0.1 mg/ml 농도의 Vit C(96.3%)에 비해 적지 않은 항산화 활성을 나타내었다. Cho 등[7]이 보고한 바에 따르면 1 mg/ml 감태 열수 추출물에서는 91.4%로 높은 활성을 보였으며, 2 mg/ml 감태 메탄올 추출물에서는 그 활성이 85%로 나타났다[25]. 본 연구결과와 비교해 볼 때 감태 열수 및 유기용매 추출물이 효소분해산물보다는 약간 높은 항산화력을 나타내고 있는데 이는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거법이 phenolic구조와 aromatic amine 화합물과 같은 항산화물질의 전자공여능을 이용한 항산화 측정법[3]이므로 추출법에 따라 항산화 작용에 차이가 나타나는 것으로 사료된다.

SOD 활성(Superoxide dismutase assay)

Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로써 세포에 유해한 oxygen radical을 과산화수소로 전환시키고, 다시 catalase

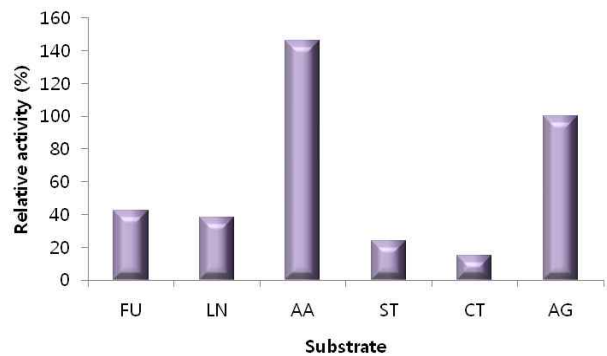


Fig. 2. Substrate specificity of extracellular enzyme from *Microbulbifer* sp. SC092 on various polysaccharides. The enzyme activity was obtained from a calibration curve prepared following the same procedure with D-galactose as the standard. FU, 1% fucoidan; LN, 1% laminarin; AA, 1% alginic acid; ST, 1% starch; CT, 1% chitin; AG, 1% agar.

Table 1. DPPH free radical scavenging and superoxide dismutase (SOD)-like activities of enzymatic products from *Ecklonia cava* by *Microbulbifer* sp. SC092

	Concentration (mg/ml)				
	0.1	0.5	1	2.5	Vit C (0.1)
DPPH	10.4±1.5	40.1±1.2	61.6±0.7	84.1±0.7	96.7±0.7
SOD	19.0±2.0	65.4±2.6	80.7±1.7	89.6±2.1	71.2±2.0

All values mean Mean±SD.

Vit C (ascorbic acid) is used as positive control.

에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로써 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사활성 물질에 대한 연구가 진행되고 있다[31].

본 연구에서 감태 효소분해산물의 SOD 활성은 농도 의존적으로 증가하였고, 2.5 mg/ml 농도에서 89.6%였으며 positive control로 사용한 0.5 mg/ml 농도의 Vit C(97.4%)와 비교한 결과 높은 활성을 나타내고 있다(Table 1). Cho 등[7]이 보고한 바에 따르면 1 mg/ml의 감태 열수 추출물에서는 SOD 유사활성에 의한 항산화력이 75.0%로 나타났으며, 이러한 결과는 높은 항산화능으로 널리 알려져 있는 녹차의 열수와 에탄올 추출물보다도 높은 것으로 항산화제로써 감태의 가치를 높이 평가할 수 있다. Kim과 Lee [20]의 보고에 의하면 감태 유기 용매 분획물 중 butanol분획물이 가장 우수한 활성을 나타내었는데(약54.0%), 본 연구 결과는 이러한 감태의 butanol 분획물의 SOD 유사활성 보다 우수한 것으로 보여지고 있다. 따라서, 높은 SOD 활성으로 항산화능을 나타내는 감태 효소분해산물이 항산화 소재로써 활용성이 매우 높을 것으로 기대된다.

항당뇨(α -Glucosidase 활성억제) 효과 연구

α -Glucosidase는 α -amylase에 의해 분해된 당질을 최종적으로 단당류로 전환시킨다. 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연 시킴으로 식후 당 농도를 제한한다. 따라서 α -glucosidase저해제는 제 2형 당뇨병과 같은 당질 관련 질병을 위한 치료제 개발에 유용하다[30].

감태 효소분해산물의 제 2형 당뇨병 환자의 당 분해를 억제할 수 있는 기능성 물질을 찾기 위한 항당뇨 효과의 지표로 α -glucosidase 저해활성 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 본 연구에서 positive control로 사용된 α -glucosidase 억제제인 acarbose는 0.5 mg/ml 농도에서 40.4%의 α -glucosidase 저해 효과를 나타냈으며, SC092로부터 추출된 감태 효소분해산물은 2.5 mg/ml 농도에서 58.7%로 농도 의존적으로 유의성이 있음을 확인하였다. 감태 열수 및 에탄올 추출물에 있어서 혈당강화효능은 이미 검증된 바 있으나 α -glucosidase 저해 효능에 대해서는 언급된 바 없으며 α -amylase 저해 효능분석을 통한

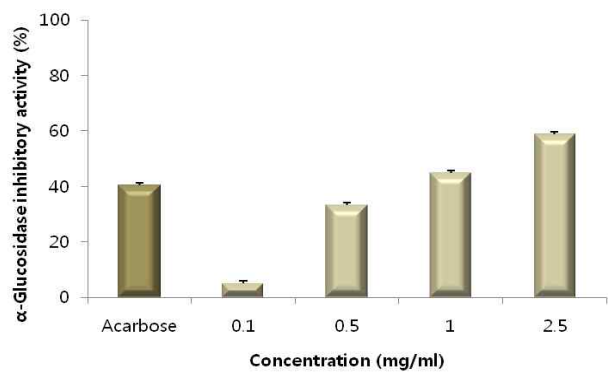


Fig. 3. α -Glucosidase inhibitory activity of enzymatic products from *Ecklonia cava* by *Microbulbifer* sp. SC092. Results are mean±S.D. of triplicate data. Acarbose (0.5 mg/ml) is used as positive control.

혈당강화효능은 2.5 mg/ml 농도의 감태 열수 추출물에서 47.1%를 나타내었다[18,19]. 이는 같은 농도의 감태 효소분해산물보다 낮은 것으로 감태의 효소적분해산물에 혈당을 강하게 시키는 물질이 함유되어 있을 것으로 추정되었고 당뇨병의 치료와 예방에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

아질산염 소거능 연구

화학적 발암물질로 알려진 nitrite는 식물이나 동물 등에 존재하며 육제품과 수산 가공품 등의 첨가제로 사용되는데, 단백질 식품이나 의약품 및 잔류 농약 등에 존재하는 2급, 3급 등의 amine류와 반응하거나 식품내의 상재 성분으로 널리 존재하고 있는 amine류를 함유하고 있는 음식물과 동시에 섭취했을 때 위내에서 발암성 물질인 nitrosamine이 생성될 가능성이 매우 높다[28]. 그러므로 산성 영역에서 nitrosamine의 생성인자인 아질산염을 효과적으로 소거하여 nitrosamine 생성을 억제하는데 기여하는 물질들을 찾고자 연구되어 왔다. 따라서 인체에 유해한 물질이라고 할 수 있는 아질산염을 효과적으로 제거할 수 있는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 감태 효소분해산물이 아질산염 소거능에 미치는 영향을 pH 별로 분석하였는데, pH는 1.2, 3.0, 6.0으로 하였고 농도는 positive control인 Vit C와 함께 0.5 mg/ml에서 살펴보았다. 그 결과, pH가 낮을수록 Vit C와 감태 효소분

해산물의 아질산염 소거능이 증가하였다. 즉, pH 1.2인 경우 0.5 mg/ml 농도의 감태 효소분해산물은 56.3%의 아질산염 소거능을 보였으며, pH 3.0에서는 40.8%로 나타났고 pH 6.0에서는 12.6%로 나타났다. 또한, positive control로 pH 1.2에서 살펴본 0.5 mg/ml 농도의 Vit C (46.0%) 보다도 우수한 활성을 나타내고 있다(Fig. 4). Cho 등[7]이 보고한 바에 따르면 pH 1.2에서 0.1~1 mg/ml 감태 열수 추출물의 아질산염 소거능은 72.8~93.6%로 확인되어졌다. 이로써 감태 효소분해산물이 감태 열수 추출물 보다는 낮지만 Vit C 보다도 높은 아질산염 소거능을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구결과를 통해 천연의 안전한 항염증 소재로 감태 효소분해산물의 이용 가능성을 기대 할 수 있었다.

알코올 분해능(ADH, ALDH 활성) 측정

체내로 흡수된 알코올의 대부분은 위장과 소장에서 흡수되어 간으로 이동된 후 대사과정을 거쳐 분해되는데, 만성적인 알코올 섭취는 영양소의 흡수장애와 간 기능 손상을 초래할 수 있다[29]. 간 조직에서 알코올 대사는 먼저 ADH 활성에 영향을 주는 요인들에 의해 조절될 수 있다. 체내에 들어온 알코올의 대부분은 간세포의 ADH 효소에 의해 acetaldehyde로 신속히 분해된 다음 ALDH 효소에 의해 산화분해 되는 과정을 거치게 된다[29]. 음주 후 실제적으로 느끼는 숙취 증상은

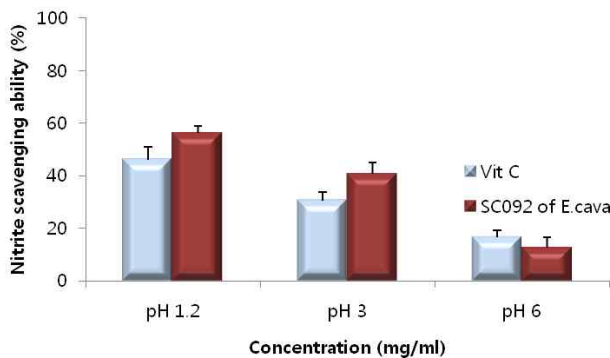


Fig. 4. Nitrite scavenging effect of enzymatic products from *Ecklonia cava* by *Microbulbifer* sp. SC092 under different pH conditions. Concentration is 0.5 mg/ml. Results are mean±S.D. of triplicate data. Vit C (0.5 mg/ml) is used as positive control.

은 acetaldehyde의 독성 작용에 의한 것이므로 가장 바람직한 숙취 해소는 ALDH 효소 활성을 좀 더 촉진 시키는데 초점이 맞추어져야 한다.

감태 효소분해산물의 ADH 활성에 미치는 효과는 반응 후의 최대 흡광도와 효소의 반응 속도를 통하여 분석하였다 (Table 2). 최대 흡광도는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 나타냈으며 대조구 흡광도의 값을 100으로 하였을 때 감태 효소분해산물을 첨가한 경우 농도 의존적으로 ADH 활성이 증가하였다. 감태 효소분해산물 추출물의 2.5 mg/ml 농도에서 ADH 활성은 123.3%로 positive control인 Hepos의 183.1% 보다 활성이 낮았지만 Cho 등[7]이 감태 열수 추출물의 농도 10 mg/ml에서 ADH 활성은 153%로 보고한 연구결과와 비교해볼 때 감태 효소분해산물이 보다 효과적인 것으로 나타났다.

감태 효소분해산물의 ALDH 활성에 미치는 효과는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 나타냈으며 대조구 흡광도의 값을 100으로 하였을 때 감태 효소분해산물을 첨가한 경우 농도 의존적으로 ALDH 활성이 증가되었다(Table 2). 감태 효소분해산물의 ALDH의 활성은 2.5 mg/ml 농도에서 215.2%로 시중에 판매되고 Hepos보다 높은 활성을 나타내었다. 특히 감태 효소분해산물은 ADH 활성보다 오히려 ALDH 활성이 높은 것으로 나타나 숙취해소에 효과가 높을 것으로 기대된다. Cho 등[7]은 감태 열수 추출물 5 mg/ml 농도에서 164%의 ALDH 활성을 보고하였다. 본 연구에서는 그 보다 훨씬 낮은 농도에서도 ALDH 활성이 높게 나와 감태 효소추출법이 소재개발에 있어서 새로운 추출방법으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 감태 효소분해산물의 높은 알코올 분해 활성을 이용하여 새로운 숙취해소 소재개발을 위한 재료로 이용할 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

미백(Tyrosinase 저해활성) 효과 연구

Tyrosinase는 멜라닌 합성의 초기단계인 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)를 거쳐 L-dopa-quinone으로의 전환에 관여하며 최종적으로 흑갈색인 melanin 색소 생성에 관여하는 효소이다. 특히, 피부는 자외선에 노출되면서 tyrosinase의 작용으로 melanosome에서 melanin이 합성되어 피부노화가 촉진되며 피부에 암갈색의

Table 2. Alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activities of enzymatic products from *Ecklonia cava* by *Microbulbifer* sp. SC092

	Concentration (mg/ml)				
	0.1	0.5	1	2.5	Hepos
ADH	94.7±0.6	104.7±1.1	112.3±0.7	123.3±1.0	183.1±1.3
ALDH	134.8±2.7	153.3±2.3	170.4±2.0	215.2±1.7	204.2±1.6

All values mean Mean±SD.
Hepos is used as positive control.

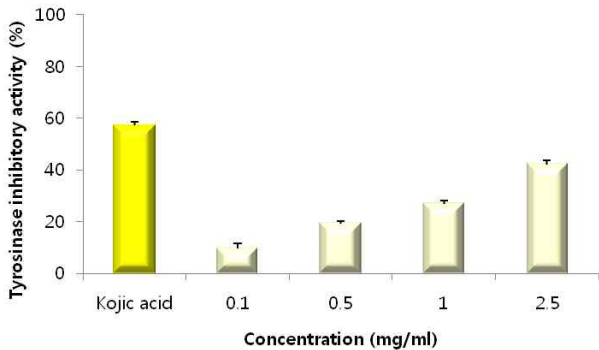


Fig. 5. Tyrosinase inhibitory effect of enzymatic products from *Ecklonia cava* by *Microbulbifer* sp. SC092 depending on concentration. Results are mean±S.D. of triplicate data. Kojic acid (0.1 mg/ml) is used as positive control.

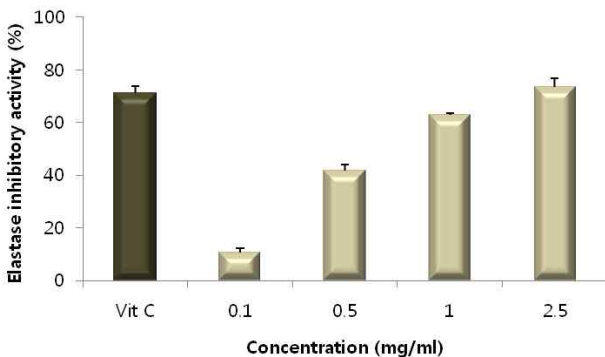


Fig. 6. Elastase inhibitory effect of enzymatic products from *Ecklonia cava* by *Microbulbifer* sp. SC092 depending on concentration. Results are mean±S.D. of triplicate data. Vit C (1 mg/ml) is used as positive control.

색소 물질을 침착시키는 원인이 된다. 따라서 tyrosinase 활성 저해제는 의약품, 화장품 등에 널리 적용되며, 인체에 부작용이 적은 천연 소재로 확보하기 위한 연구가 집중되고 있다[21]. 잘 알려진 tyrosinase 활성 저해제로는 aromatic aldehyde, aromatic acids, tropolone 및 kojic acid 등이 있다.

본 연구에서는 melanin 색소 생성에 관여하는 tyrosinase에 대한 감태 효소분해산물의 농도별 저해효과를 나타내었다 (Fig. 5). Positive control로 사용한 kojic acid는 0.1 mg/ml 농도에서 57.4%의 tyrosinase 억제효과를 보였으며, 감태 효소분해산물의 tyrosinase 저해 효능은 2.5 mg/ml 농도에서 42.2%로 낮은 수치를 나타내고 있으나 농도 의존적으로 그 활성이 증가하고 있으므로 감태 효소분해산물의 우수한 미백 효능을 기대할 수 있다. Cho 등[7]은 감태 열수 추출물의 10 mg/ml 농도에서 58%의 저해 효능을 보고하였는데, 본 연구 결과와 비교해 볼때 감태 효소분해산물이 미용·식품 소재로 열수 추출물보다 효과적인 것으로 그 활용가치가 높을 것으로 판단된다.

피부탄력, 주름억제(Elastase 저해활성) 효과 연구

Elastin은 진피 내 전체 단백질의 2% 뿐이지만 사람의 피부가 탄력을 갖고 생리적인 기능을 하는 데에는 중요한 역할을 한다. Elastin과 collagen 단백질을 만드는 효소와 이들을 분해하는 효소가 균형을 유지해야 정상 피부로 탄력과 구조를 갖출 수 있다. Elastase의 활성이 높아지게 되면 collagen을 비특이적으로 분해하여 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발하게 되므로 elastase저해제는 피부에 탄력을 주고 주름을 개선하는 효과가 있다[8,22].

감태 효소분해산물의 elastase 저해활성은 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 6). 감태 효소분해산물의 elastase 저해 활성은 2.5 mg/ml 농도에서 73.1%였으며, elastase 저해활성이 높은 것으로 알려진 Vit C는 1 mg/ml 농도에서 72.2%의 저해 활성을 나타내었다. Cho 등[7]은 감태 열수 추출물 1 mg/ml 농도에서 44%의 저해 효능, Bu 등[5]도 감태의 elastase 억제 효과에 대하여 보고하였다. 이로써 감태 효소분해산물의 elastase 활성이 열수 추출물에 비해서 효과적인 것으로 나타나 본 연구에서 사용한 감태 효소추출법이 새로운 미용 소재를 발굴하는데 효과적인 추출법인 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단에서 주관하는 지역혁신인력양성사업으로부터 지원을 받아 연구되었습니다.

References

- Bae, J. M., Cho, E. K., Kim, H. Y., Kang, S. H. and Choi, Y. J. 2012. Biological analysis of enzymatic extracts from *Capsosiphon fulvescens* using marine bacterium *Microbulbifer* sp. AJ-3. *J. Life Sci.* **22**, 627-633.
- Bergmeyer, H. U. 1974. Methods of enzymatic analysis. *Academic Press, New York* pp. 28.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1198-1200.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bu, H. J., Ham, Y. M., Kim, J. M., Lee, S. J., Hyun, J. W. and Lee, N. H. 2006. Elastase and hyaluronidase inhibition activities of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava*. *Korean J. Pharmacogn.* **37**, 92-96.
- Cha, M. H. and Kim, Y. K. 2008. Analysis of consumption values of a seaweed functional food. *Korean J. Food Culture* **23**, 462-468.
- Cho, E. K. and Choi, Y. J. 2010. Physiological activities of hot water extracts from *Ecklonia cava* Kjellman. *J. Life Sci.* **20**, 1675-1682.

8. Dewitt, D. L., Rollins, T., Day, J. S., Gauger, J. A. and Smith, W. L. 1981. Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **256**, 10375-10382.
9. Gray, J. I. and Dugan Jr, L. R. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* **40**, 981-984.
10. Haug, A., Larsen, B. and Smidsrod, O. 1966. A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta. Chemica. Scand* **20**, 183-190.
11. 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.
12. Heu, M. S., Yoon, M. S., Kim, H. J., Park, K. H., Lee, J. H., Jo, M. R., Lee, J. S., Jeon, Y. J. and Kim, J. S. 2010. Improvement on the antioxidant activity of instant noodles containing enzymatic extracts from *Ecklonia cava* and its quality characterization. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **43**, 391-399.
13. James, A. E. K., Timothy, D. W. and Gorden, L. 1996. Inhibition of human leucocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic tyrosinase inhibitors. *Biochem* **35**, 9090-9096.
14. Jimenez-Escring, A. and Goni Cambrodon, I. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch. Latianam. Nutr.* **49**, 114-120.
15. 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.
16. Joo, D. S., Lee, J. K., Choi, Y. S., Cho, S. Y., Je, Y. K. and Choi, J. W. 2003. Effect of sea tangle oligosaccharide drink on serum and hepatic lipids in rats fed a hyperlipidemic diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1364-1369.
17. Jung, E. Y. and Lee, S. K. 2007. Antioxidant activities and regeneration effect in HaCaT cell line by Jeju Island aboriginal *Ecklonia cava*. *J. Korean Soc. Cosm.* **13**, 1071-1077.
18. Kim, D.-H., Jung, J.-Y., Kim, K.-B.-W.-R., Lee, C.-J., Kwak, J.-H., Kim M.-J., Sun, W.-C., Kim, H.-J., Jung, S.-A., Kim, T.-W., Cho, Y.-J. and Ahn, D.-H. 2011. Effects of heat and pH treatments on α -amylase inhibitory activity of *Ecklonia cava* ethanol extract. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **44**, 791-795.
19. Kim, E., Kim, M.-S., Kim, S.-Y. and Kim, H.-A. 2008. Effect of *Ecklonia cava* on the blood glucose, lipids and renal oxidative stress in diabetic rats. *Korean J. Food Culture* **23**, 812-819.
20. Kim, J. A. and Lee, J. M. 2004. The changes of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Ecklonia cava* with blanching times. *Korean J. Food Culture* **19**, 369-377.
21. Kim, J. W., Kim, D. K., Park, J. S., Lee, Y. K., Beik, K. Y. and Kim, S. D. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of shark collagens, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J. Food Preserv.* **16**, 419-426.
22. Kim, M. K., Kim, J. Y., Choi, S. W., Hong, J. T. and Yoon, K. S. 2004. Anti-wrinkle effect of safflower (*Cathamustinctorius*) seed extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **30**, 15-22.
23. Koivula, T. and Koivusalo, M. 1975. Different from of rat liver aldehyde dehydrogenase and their subcellular distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* **397**, 9-23.
24. Lee, H. O., Kim, D. S., Do, J. R. and Ko, Y. S. 1999. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish Soc.* **32**, 427-431.
25. 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. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1139-1145.
26. Leelarungrayub, N., Rattanapanone, V., Chanarat, N. and Gebicki, J. M. 2006. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition* **22**, 266-274.
27. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426.
28. 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 scavenger derived from seeds of *Cassia tora* L. *Korea J. Food Sci. Technol.* **27**, 124-128.
29. Peters, T. J. 1982. Ethanol metabolism. *Bri. Med. Bull.* **38**, 17-20.
30. Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumer, S., Placido, J. and William, Z. S. 2008. α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn). Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Res.* **343**, 1278-1281.
31. Sies, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Bio. Med.* **27**, 916-921.
32. Song, H. J. 2009. Molecular cloning and characterization of agarase gene from marine bacterium, *Microbulbifer* sp. AJ-3. MS Thesis. Silla University.
33. Tibbot, B. K. and Skadsen, R. W. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from berley. *Plant Mol. Biol.* **30**, 229-241.
34. Wiseman, H. 1996. Dietary influences on membrane function; important in protection against oxidative damage and disease. *J. Nutri. Biochem.* **7**, 2-6.
35. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom tyrosinase by aloe extract. *Planta Medica.* **53**, 517-519.

초록 : 감태(*E. cava* Kjellman) 효소분해산물의 항당뇨 및 알코올 분해능과 미용효과

김혜윤[†] · 조은경[†] · 강수희 · 배정미 · 최영주*

(신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과)

본 연구에서는 기장 해안의 해수에서 분리한 해양 미생물로부터 해조류의 난소화성 복합다당류를 분해하는 균주를 분리하고 동정하여 *Microbulbifer* sp. SC092로 명명하였다. *Microbulbifer* sp. SC092 미생물에 의하여 생성된 조효소의 기질 특이성 분석으로 agar 및 alginic acid를 분해하는 효소활성이 각각 146.2%로 agarase와 alginase 효소활성이 높은 것으로 나타났다. 감태 효소분해산물의 항산화력은 DPPH radical 소거능과 SOD 활성으로 측정하였으며, DPPH radical 소거능과 SOD 활성은 각각 84.1, 89.6%로 나타났다. 감태 효소분해산물의 혈당 강하능은 α -glucosidase 활성억제 효과를 측정하였으며 α -glucosidase 활성은 58.7%로 나타났다. 감태 효소분해산물의 항염증 소재로써 이용 가능성은 인체의 위의 pH와 비슷한 조건에서 아질산염소거능 측정으로 확인하였는데, 0.5 mg/ml 농도에서 56.3%를 나타내어 positive control로 사용한 Vit C 보다 높은 활성을 보였다. 알코올분해능은 ADH와 ALDH 활성을 측정한 결과는 각각 123.3, 215.2%로 나타나 감태 효소분해산물의 우수한 숙취해소 효능을 보였다. 감태 효소분해산물의 미백 및 주름개선기능은 tyrosinase 및 elastase 저해효과로 분석하였다. 감태 효소분해산물의 농도가 증가함에 따라 미백 및 주름개선기능은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 분해산물의 농도 2.5 mg/ml 농도에서 각각 42.2%와 73.1%로 높은 저해 효능을 나타내었다. 이러한 결과는 효소 추출법이 새로운 기능성 소재를 발굴하는데 효과적인 추출법인 것으로 기대된다.