

## 동결건조 진주담치 추출물의 항산화 및 DNA 손상 보호 활성

이선우<sup>1</sup> · 최미주<sup>1</sup> · 김시경<sup>2</sup> · 이승철<sup>2</sup> · 박은주<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경남대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>경남대학교 식품생명학과

### Antioxidant and DNA Damage Protective Activities of Freeze-Dried Blue Mussel (*Mytilus edulis*)

Seon Woo Lee<sup>1</sup>, Mi-Joo Choi<sup>1</sup>, Si-Kyung Kim<sup>2</sup>, Seung-Cheol Lee<sup>2</sup>, and Eunju Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition and <sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University

**ABSTRACT** Blue mussels (*Mytilus edulis*) are widely distributed among the world's oceans in various habitats. The purpose of this study was to investigate the effects of freeze-drying on the antioxidant and antigenotoxic activities of blue mussels collected in the Gyeongnam coast area of Korea. Raw (RM) and freeze-dried blue mussel flesh (FRM) were extracted with ethanol, methanol, and water. Antioxidant activities were evaluated on the basis of DPPH radical scavenging activity, oxygen radical absorbance capacity (ORAC), cellular antioxidant capacity (CAC), and antigenotoxic activity (comet assay). Except for the water extract, RM and FRM showed DPPH radical scavenging activities, which increased upon freeze-drying in MeOH extract. The highest ORAC value was observed in water extract of RM and MeOH extract of FRM. CAC was protected against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells by both RM and FRM extracts. Freeze-drying lowered ORAC value of water extract, whereas it increased CAC activity, suggesting that antioxidant activities varied according to the generated radicals. All extracts from RM and FRM showed antigenotoxic activities by reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in human leukocytes. Freeze-drying had no effect on antigenotoxicity of blue mussels. Taken together, these results indicate that blue mussels possess antioxidant and antigenotoxic properties, and freeze-drying might be a useful processing method for blue mussels to retain their maximum physiological potential as a functional food.

**Key words:** blue mussels (*Mytilus edulis*), freeze-drying, antioxidant activities, antigenotoxic effect, functional food

## 서 론

대기오염, 흡연 등은 인체 내 유해한 물질의 축적을 유발하고 이로 인해 체내 활성산소(ROS)의 발생이 증가되면서 산화적 스트레스를 일으키게 된다(1). 산화적 스트레스는 DNA 구조 손상을 비롯한 변형을 유발하여 노화, 암, 심혈관계 질환 등을 증가시키는 원인이 되고 있다(2,3). 과일과 채소에 포함된 비타민 C, 비타민 E와 같은 다양한 항산화제의 섭취는 산화적 스트레스로 인한 질병 예방에 도움이 된다고 널리 알려져 있으나 식품 첨가물로 사용되는 butylated hydroxyanisole(BHA)과 butylated hydroxytoluene(BHT) 등의 합성 항산화제는 인체에 독성을 일으키는 등의 논란으로 인해 사용이 제한되고 있다(4). 따라서 인체에 해가 없는 다양한 종류의 동·식물 자원에 대한 항산화 활성을 검색하

고 이를 토대로 효과적인 건강 기능성 식품을 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다(5).

해양생물은 구조적으로 다양한 생리활성 복합물과 함께 기능성 식품, 약제, 화장품 등으로서의 가치가 풍부한 자원으로 지금까지 미더덕, 해조, 아귀, 멧게, 해삼 등과 같은 해양생물의 항산화 활성 또는 항유전독성이 보고된 바 있으나(6-11) 농산물에 비해 해양생물의 기능성 연구는 아직까지는 부족한 실정이다.

홍합은 살이 붉어서 붙여진 이름으로 조개, 굴, 가리비 등과 같이 두 개의 껍각으로 이루어진 이매패류로 분류되며 해산물임에도 불구하고 짜지 않고 담백하여 담채라고도 불린다(12). 예로부터 우리 민족이 즐겨 먹는 기호식품으로써 이용되어 온 홍합에는 셀레늄과 요오드같은 미네랄 성분이 풍부하고, 프로비타민 D의 함량이 높아 칼슘의 흡수를 높여 주어 뼈의 골밀도를 높여줄 뿐만 아니라 철분도 다량 함유되어 있어 빈혈 개선에 도움을 준다(13). 홍합류에 속하는 진주담치(*Mytilus edulis*)의 원산지는 지중해이며 빠른 번식력과 환경적응력으로 세계적으로 분포하게 되었다. 현재 우

Received 12 September 2014; Accepted 23 November 2014

Corresponding author: Eunju Park, Department of Food and Nutrition of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea  
E-mail: pej@kyungnam.ac.kr, Phone: +82-55-249-2218

리나라 전 연안에 널리 서식하고 있으나 주로 남해안에 분포하며 특히 경남의 창원외의 마산만 일대에서 가장 많이 생산되고 있다(14).

뉴질랜드에서 채취되는 초록잎홍합(*Perna canaliculatus*)의 경우 염증성 장 질환과 관절염에 대한 효과가 보고된 바 있고(15,16), 그 추출물을 이용해 제조한 기능성 식품이 판매되고 있다. 우리나라에서 국내산 원료를 이용하여 동등한 효과를 가진 기능성 식품을 개발하게 된다면 수입대체 효과의 경제적 이익을 기대할 수 있지만(17) 지금까지 우리나라에서 생산되는 진주담치의 항산화 활성을 분석한 연구는 미비한 실정이다. 게다가 진주담치와 같은 패류는 여름철에 유통이 어려운 단점이 있어 건조 또는 분말 형태로 가공되어 유통되는데 가공처리 중에 이로운 활성이 감소되는 것으로 인식하는 경우가 많다. 진주담치의 가공처리 후 품질의 안정성에 대한 연구(18)는 이미 보고되어 있지만 가공 전후의 활성 변화에 관해서는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 진주담치를 신선한 상태와 동결건조 한 상태에 따라 항산화 활성 및 항유전독성 효과를 비교 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에서 사용된 진주담치는 2013년 5월에 채취된 것을 창원시 마산수협으로부터 신선한 상태로 제공받았다. 항산화 활성 분석을 위한 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하였고, 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl(DPPH), gallic acid, pyrogallol, Histo-paque 1077, fluorescein은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Trizma hydrochloride(Tris-HCl), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate(EDTA), dimethyl sulfoxide(DMSO), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonyl acid(Trolox) 등을 비롯한 기타 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 시료준비

진주담치 시료는 껍질을 제거한 가식부만을 사용하였고, 생 진주담치 추출물(raw blue mussels, RM)은 생 진주담치 살 50 g, 동결건조 진주담치 추출물(freeze-dried blue mussels, FRM)은 생 진주담치 살 50 g을 동결건조 한 분말에 각각 에탄올, 메탄올, 물 500 mL를 넣어 25°C에서 12시간 추출하였다. 에탄올과 메탄올 추출물은 회전 진공농축기(Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하고, 물 추출물은 동결건조 다음 분말화하여 50 mg/mL의 농도로 DMSO에 희석한 후 -20°C에 보관하면서 분석에 사용하였다.

### DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity, RSA) 측정

DPPH 라디칼 소거능은 에탄올로 녹인 0.4 mM DPPH 용액 80 µL에 각 농도별 시료(1, 5, 10 mg/mL) 20 µL를 가한 후 10초 동안 혼합하고 상온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader(Sunrise, Tecan Co. Ltd., Grödig, Austria)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구에는 20 µL의 DMSO를 처리하여 측정하였고 자체 흡광도를 측정하여 원 시료의 색을 보정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래의 계산식을 이용해 값을 산출하였다. DPPH 라디칼을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>(inhibitory concentration) 값을 구하여 나타내었다.

Radical scavenging activity (RSA, %)=(1 - A/B)×100

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 대조구 흡광도

### ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 활성 분석

ORAC assay를 이용한 항산화 활성 측정은 Kurihara 등(19)의 방법을 이용하여 신선한 상태와 동결건조 상태에 따른 진주담치 추출물(10, 25, 50, 100 µg/mL)의 활성을 측정하였다. AAPH를 peroxy radical generator로 사용하여 최종 반응 농도는 20 nM이 되도록 처리하였고, Ou 등(20)의 방법에 따라 형광표준 용액인 fluorescein의 최종 반응 농도는 40 nM이 되도록 처리하였다. 최종 반응 농도 1 µM의 trolox를 control standard로 사용하였다. Fluorescein은 free radical에 의해 감소되고 이는 FLUOstar OPTIMA micro-plate reader(BMG Lab Technology, Offenburg, Germany)를 이용하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 150 cycle 동안 측정하였다. ORAC value는 각 시료의 형광 감소 곡선 아래 부분의 총 면적(net area under the curve)을 산출하여 1 µM trolox equivalents(TE)로 나타내었으며 각 시료는 최소 3번 반복하여 실험하였다.

Net area under the curve: net AUC=AUC<sub>sample</sub> - AUC<sub>blank</sub>

ORAC value=net AUC<sub>sample</sub>/ net AUC<sub>trolox</sub>

### HepG2 세포 배양

HepG2(ATCC 8065, human liver adenocarcinoma cell-line) 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 비활성화한 fetal bovine serum(FBS) 10%와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)를 함유하는 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### MTT assay를 통한 세포 생존율 측정

진주담치 육질 추출물에 대한 HepG2 세포의 생존율을 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 96-well plate에 세포수를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 계산하여 100 µL씩 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동

안 배양한 후 DMSO에 녹인 시료를 최종 농도가 5, 10, 25, 50  $\mu\text{L}$ 가 되도록 각 well에 처리하였다. 37°C에서 3시간 배양하고 PBS 완충액에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액을 10  $\mu\text{L}$ 씩 처리하고 다시 1시간 동안 배양하였다. Formazan 형성을 확인한 후 배지를 제거하고 100  $\mu\text{L}$ 의 DMSO로 각 well 바닥에 형성된 formazan을 용해시켜 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포를 100%로 하여 상대적인 세포 생존율을 산출하였다. 각 시료에 대한 실험은 최소 3번 반복하여 실험하였다.

### ROS 소거능(cellular antioxidant capacity, CAC) 측정

HepG2 세포를 이용하여 진주담치 추출물 시료의 항산화 활성을 검색하기 위해 CAC assay를 실시하였다. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 방법(21)을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 HepG2 세포를  $5 \times 10^5$  cells/mL로 계산하여 100  $\mu\text{L}$ 씩 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 형광에 안정한 Hank's balanced salt solution(HBSS)을 200  $\mu\text{L}$ 씩 분주한 후 최종 농도가 5, 10, 25, 50  $\mu\text{L}$ 가 되도록 각 well에 처리하여 30분 동안 배양하였다. HBSS 200  $\mu\text{L}$ 로 세척을 하고 다시 HBSS 200  $\mu\text{L}$ 를 분주한 후 peroxy radical generator인 AAPH 8 mM을 2  $\mu\text{L}$ 씩 처리한 후 30분 동안 배양하였다. 이때 AAPH는 매일 당일 제조하여 사용하였다. 형광 probe로 40 mM DCFH-DA 2  $\mu\text{L}$ 를 빛이 차단된 상태에서 첨가한 다음 30분 동안 배양한 후 FLUOstar OPTIMA micro-plate reader(BMG Lab Technology)를 이용하여 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 형광의 발생 정도를 측정하였다. Negative control은 DCFH-DA만을 처리하였고, positive control은 AAPH와 DCFH-DA를 처리하였다. Negative control의 형광 값을 100%로 하여 각 시료와 positive control인 AAPH의 형광 값을 비교하였다. 각 시료에 대한 실험은 최소 3번 반복하여 실험하였다.

### DNA 손상도(comet assay) 측정

진주담치 추출물의 항유전독성 효과는 Singh 등(22)의 alkaline comet assay 방법을 변형하여 측정하였다. 건강한 성인 남성의 혈액을 채취한 후 동량의 histopaque 1077을 사용하여 백혈구를 분리하여 실험에 사용하였다. 백혈구에 DMSO로 희석한 시료를 농도별(1, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하여 37°C에서 30분간 반응시키고 세척한 다음 산화적 스트레스를 유발하기 위해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 4°C에서 5분간 반응시킨 후 다시 세척하였다. 반응을 끝낸 백혈구에 0.7% low melting agarose gel(LMA) 100  $\mu\text{L}$ 와 섞은 다음 1% normal melting agarose(NMA)로 precoating 된 슬라이드 위에 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 커버글래스로 덮어 4°C 냉장고에 방치하였다. 젤이 굳으면 커버글래스를 벗겨

내고 그 위에 다시 0.7% LMA 100  $\mu\text{L}$ 를 분주하여 4°C에 방치하였다. 젤이 다 굳으면 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% sodium lauryl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 슬라이드를 담가 저온 암실에서 1시간 동안 방치시켜 DNA 이중 가닥을 풀어주었다. Lysis가 끝난 후 슬라이드를 전기영동 수조에 배열하고 4°C의 차가운 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH>13)를 채워 20분 동안 unwinding 하여 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 $\pm$ 3 mA의 전압으로 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 슬라이드를 차가운 중성용액(0.4 M Tris buffer, pH 7.5)에 5분간 3회 세척한 다음 에탄올에 5분간 침지, 건조시켰다. 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ethidium bromide로 염색한 후 슬라이드를 형광현미경(LEICA DMLB, Wetzlar, Germany)의 CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 세포핵 이미지를 comet image analyzing system(Komet version 5.0, Kinetic Imaging, Liverpool, UK)을 이용해 분석하였다. 백혈구의 산화적 스트레스 유발에 의한 DNA의 손상 정도는 핵으로부터 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA 함량(% Tail intensity)을 측정하여 나타내었다.

### 통계처리

모든 데이터의 통계처리는 SPSS, Windows 14.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였고 결과는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타내었으며, 신뢰 수준 95%( $P < 0.05$ )에서 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다. Tukey's HSD test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 용매별 또는 동결건조 전후의 평균값에 대한 유의적 차이는 Student *t*-test를 통해 검증하였다( $P < 0.05$ ).

## 결과 및 고찰

### DPPH 라디칼 소거능

진주담치의 용매별 추출물의 DPPH 라디칼 소거능(DPPH RSA)은 Table 1과 같다. 생 진주담치와 동결건조 진주담치의 에탄올 및 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 1, 5, 10 mg/mL에서 농도 의존적으로 증가하였으나 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성은 없는 것으로 나타났다. 생 진주담치와 동결건조 진주담치를 용매별 고농도에서 비교했을 때 에탄올 추출물의 경우 동결건조 전후의 값이 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, 메탄올 추출물에서는 생 진주담치보다 동결건조 진주담치에서 유의적으로 높은 값을 확인할 수 있었다. 에탄올 추출물의 경우 동결건조가 DPPH 라디칼 소거능에 영향을 미치지 않았으나, 메탄올 추출물의 경우 동결건조로 인해 오히려 DPPH 라디칼 소거능이 더 증가한 것으로 나타났다. 최근 Wang 등(23)의 연구에 의해 blue mussel의 단백질 가수분해효소(pepsin, papain, neutrase,

**Table 1.** DPPH radical scavenging activity of extracts from raw and freeze-dried blue mussels (%)

	Concentration (mg/mL)	Sample extraction		
		EtOH	MeOH	Water
RM <sup>1)</sup>	1	18.9±1.0 <sup>a2)3)</sup>	15.9±1.9 <sup>a</sup>	—
	5	50.7±2.1 <sup>b</sup>	27.3±7.7 <sup>b</sup>	—
	10	66.5±2.4 <sup>c</sup>	35.0±6.3 <sup>c</sup>	—
FRM	1	18.6±0.6 <sup>a</sup>	23.7±1.0 <sup>a</sup>	—
	5	39.6±0.5 <sup>b</sup>	39.8±0.3 <sup>b</sup>	—
	10	71.1±1.8 <sup>c</sup>	51.7±5.2 <sup>c#</sup>	—

<sup>1)</sup>RM: raw blue mussels flesh, FRM: freeze-dried blue mussels flesh.

<sup>2)</sup>Values are mean with standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup>For all the values of each sample, different letters within each column mean significant differences ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

<sup>#</sup>Stands for significant difference ( $P<0.05$ ) between RM and FRM by Student's *t*-test.

alcalase) 처리에 의해 생성된 단백질 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능 및 지질과산화 억제능에 대한 연구 결과가 보고되었다. 그 밖에 해양생물에 대한 DPPH 라디칼 소거능에 관한 연구로는 미더덕, 아귀, 명게 등의 활성이 보고된 바 있다(6-11). 진주담치와 유사한 해양생물인 미더덕 살부위의 동결건조 전후의 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 결과 1 mg/mL 농도에서 신선 미더덕의 에탄올과 메탄올 추출물에서 각각 8.8%와 9.4%로 나타났고, 동결건조의 경우 8.3%, 7.7%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 것으로 보고되었다(7). 이에 비해 동일한 농도인 1 mg/mL에서 생 진주담치는 18.9%와 15.9%의 활성을 나타내었으며, 동결건조 진주담치의 경우 18.6%와 23.7%의 활성을 나타내어 미더덕에 비해 더욱 높은 DPPH 라디칼 소거능을 가지는 것으로 분석되었다. 미더덕의 물 추출물에서는 DPPH 라디칼 소거 활성이 나타난 반면, 진주담치의 물 추출물에서 활성이 나타나지 않은 것은 진주담치의 경우 DPPH 라디칼 소거능을 보이는 물질이 물에 의해 추출되지 않은 것으로 사료된다.

### Oxygen radical absorbance capacity(ORAC)

진주담치의 용매별 추출물을 각각 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 ORAC 수치를 측정된 결과 모든 시료의 ORAC 수치가 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다(Table 2). 100 µg/mL의 농도에서 각 시료의 ORAC 수치를 비교하였을 때 생 진주담치의 경우 물> 메탄올> 에탄올 추출물 순으로 높게 나타났으며, 동결건조 진주담치의 경우 메탄올> 에탄올> 물 추출물 순으로 높게 나타났다. 에탄올과 메탄올 추출물의 경우 동결건조 후 ORAC 수치의 변화가 없었으나 물 추출물의 경우 동결건조에 의해 ORAC 수치가 유의적으로 59.1% 감소하였음을 확인할 수 있었는데, 이는 진주담치의 동결건조과정에서 AAPH(peroxyl radical generator)에 의해 생성된 peroxyl radical(ROO·) 억제 활성을 나타내는 성분의 변화가 생긴 것으로 사료된다. 또한

**Table 2.** Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of extracts from raw and freeze-dried blue mussels

	Concentration (µg/mL)	Sample extraction		
		EtOH	MeOH	Water
RM <sup>1)</sup>	10	1.3±0.1 <sup>a2)3)</sup>	2.2±0.1 <sup>a</sup>	2.9±0.1 <sup>a</sup>
	25	2.7±0.2 <sup>b</sup>	3.8±0.2 <sup>b</sup>	5.5±0.1 <sup>b</sup>
	50	4.4±0.1 <sup>c</sup>	5.9±0.0 <sup>c</sup>	8.2±0.4 <sup>c</sup>
	100	6.7±0.2 <sup>dA4)</sup>	9.0±0.1 <sup>dB</sup>	13.2±0.1 <sup>dC</sup>
FRM	10	1.5±0.2 <sup>a</sup>	2.0±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.1 <sup>a</sup>
	25	3.0±0.1 <sup>b</sup>	3.5±0.3 <sup>b</sup>	2.4±0.1 <sup>b</sup>
	50	4.6±0.1 <sup>c</sup>	6.1±0.1 <sup>c</sup>	3.4±0.2 <sup>c</sup>
	100	7.0±0.4 <sup>dB</sup>	9.1±0.5 <sup>dC</sup>	5.4±0.0 <sup>dA###</sup>

<sup>1)</sup>RM: raw blue mussels flesh, FRM: freeze-dried blue mussels flesh.

<sup>2)</sup>Values are mean with standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup>For all the values of each sample, different small letters within each column mean significant differences ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

<sup>4)</sup>Different capital letters mean significant differences among solvent extracts at the highest concentration (100 µg/mL) of RM or FRM ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

<sup>###</sup>Stands for significant difference ( $P<0.001$ ) between RM and FRM at 100 µg/mL by Student's *t*-test.

진주담치 물 추출물은 DPPH 라디칼 소거 활성이 나타나지 않은 것과는 달리 우수한 ORAC 활성을 가지는 것으로 나타났다. 이는 두 방법에서의 소거 대상이 되는 라디칼(DPPH: nitrogen radical vs. ORAC: peroxy radical)의 차이로 인해 진주담치 물 추출물의 항산화 활성이 다르게 나타난 것으로 사료된다(24,25).

### ROS 소거능(CAC) 측정

CAC assay는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe를 이용하여 측정하는 fluorometric assay로 항산화제의 세포막 침투 정도와 세포 내에서 AAPH로 유도된 peroxyl radical을 소거하는 항산화제 활성 정도를 측정할 수 있다. CAC 측정 시 시료의 세포독성으로 인해 세포가 사멸되면 감소한 세포수로 인해 형광 값이 낮게 측정되어 시료의 항산화 활성이 높은 것으로 오인될 수 있기 때문에 CAC assay를 수행하기에 앞서 MTT assay를 실시하여 진주담치 처리에 의한 HepG2 세포의 생존율을 측정하였다. 모든 시료를 5, 10, 25, 50 µg/mL가 최종 농도가 되도록 세포에 처리하였을 때 HepG2 세포의 생존율은 80% 이상으로 시료에 의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다(data not shown). 이후 실시한 CAC assay 결과는 Table 3에 제시하였다. AAPH를 처리하지 않은 음성대조구의 형광 값을 100%로 계산했을 때 8 mM의 AAPH만을 처리한 양성대조구는 HepG2 세포 내 라디칼 활성이 2배 이상 높게 나타난 반면, 생 또는 동결건조 진주담치 추출물의 경우 농도 의존적으로 세포 내 라디칼 활성을 떨어뜨리는 것으로 나타났다. 고농도(50 µg/mL)에서 용매별로 비교했을 때 생 진주담치의 경우 용매별 활성의 유의적인 차이가 없었으나 동결건조

**Table 3.** Radical scavenging capacity of raw and freeze-dried blue mussels against 80 mM AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cell (% of negative control)

	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sample extraction		
		EtOH	MeOH	Water
RM <sup>1)</sup>	NC	100.0 $\pm$ 1.5 <sup>a2)3)</sup>	100.0 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	100.0 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
	AAPH	246.4 $\pm$ 5.6 <sup>c</sup>	226.4 $\pm$ 3.7 <sup>c</sup>	176.2 $\pm$ 2.8 <sup>d</sup>
	1	201.4 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>	187.6 $\pm$ 4.1 <sup>d</sup>	141.1 $\pm$ 2.1 <sup>c</sup>
	10	186.3 $\pm$ 3.0 <sup>d</sup>	180.6 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	135.2 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>
	25	166.5 $\pm$ 7.7 <sup>c</sup>	168.1 $\pm$ 3.6 <sup>c</sup>	130.9 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
	50	145.0 $\pm$ 12.0 <sup>ba</sup>	128.9 $\pm$ 5.3 <sup>ba</sup>	132.5 $\pm$ 1.3 <sup>ba</sup>
FRM	NC	100.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	100.0 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	100.0 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
	AAPH	246.4 $\pm$ 5.6 <sup>c</sup>	226.4 $\pm$ 3.7 <sup>c</sup>	176.2 $\pm$ 2.8 <sup>c</sup>
	1	189.0 $\pm$ 8.2 <sup>d</sup>	176.8 $\pm$ 4.1 <sup>d</sup>	142.0 $\pm$ 1.6 <sup>d</sup>
	10	176.0 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	178.6 $\pm$ 1.3 <sup>d</sup>	133.3 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>
	25	149.5 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>	154.1 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	130.6 $\pm$ 2.1 <sup>c</sup>
	50	127.2 $\pm$ 6.6 <sup>ba</sup>	139.2 $\pm$ 0.2 <sup>bb</sup>	120.2 $\pm$ 1.3 <sup>ba###</sup>

<sup>1)</sup>RM: raw blue mussels flesh, FRM: freeze-dried blue mussels flesh.

<sup>2)</sup>Values are mean with standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup>For all the values of each sample, different small letters within each column mean significant differences ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

<sup>4)</sup>Different capital letters mean significant differences among solvent extracts at the highest concentration (50  $\mu\text{g/mL}$ ) of RM or FRM ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

<sup>###</sup>Stands for significant difference ( $P<0.001$ ) between RM and FRM at 50  $\mu\text{g/mL}$  by Student's *t*-test.

진주담치의 경우 에탄올 추출물과 물 추출물의 활성이 메탄올 추출물의 활성에 비해 높게 나타났다. 또한 물 추출물은 동결건조 처리로 인해 CAC 활성이 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있었다.

**Table 4.** Tail intensity of raw and freeze-dried blue mussels against 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  induced DNA damage in human leukocytes (% Tail intensity)

	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sample extraction		
		EtOH	MeOH	Water
RM <sup>1)</sup>	NC	13.8 $\pm$ 1.6 <sup>a2)3)</sup>	13.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
	PC	87.0 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	87.0 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	87.0 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>
	1	78.0 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	71.3 $\pm$ 4.6 <sup>c</sup>	79.0 $\pm$ 3.4 <sup>cd</sup>
	10	71.5 $\pm$ 3.0 <sup>bc</sup>	62.3 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	70.7 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>
	50	65.2 $\pm$ 1.5 <sup>ba</sup>	47.3 $\pm$ 2.7 <sup>ba</sup>	50.9 $\pm$ 2.9 <sup>ba</sup>
FRM	NC	13.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>
	PC	87.0 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	87.0 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	87.0 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>
	1	76.5 $\pm$ 1.6 <sup>bc</sup>	72.2 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	78.0 $\pm$ 2.7 <sup>cd</sup>
	10	69.3 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	60.6 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	66.7 $\pm$ 6.8 <sup>c</sup>
	50	70.3 $\pm$ 5.4 <sup>bb</sup>	47.7 $\pm$ 6.8 <sup>ba</sup>	46.8 $\pm$ 3.0 <sup>ba</sup>

<sup>1)</sup>RM: raw blue mussels flesh, FRM: freeze-dried blue mussels flesh.

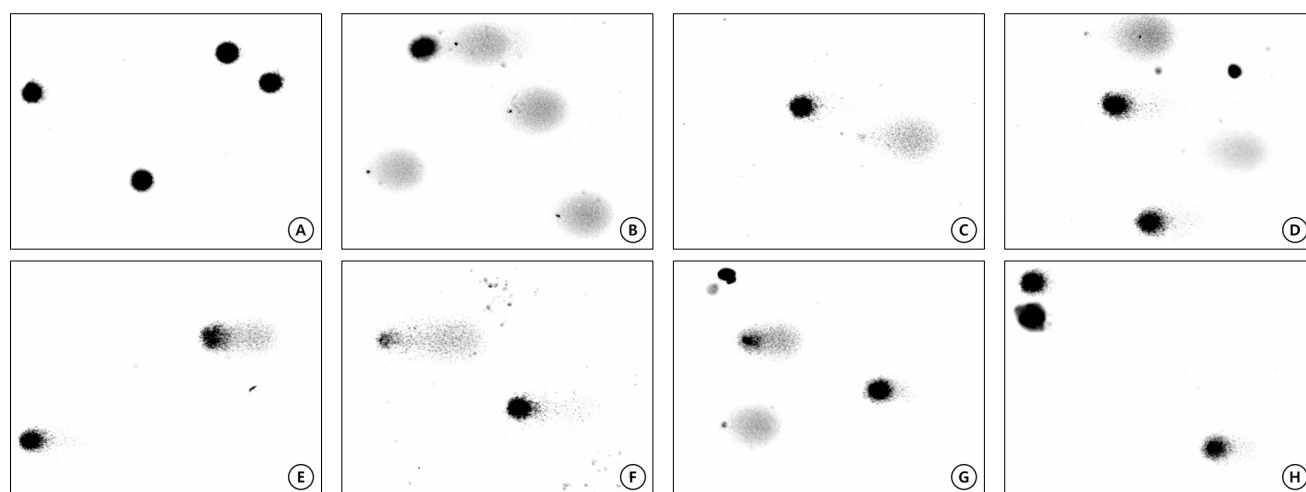
<sup>2)</sup>Values are mean with standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup>For all the values of each sample, different small letters within each column mean significant differences ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

<sup>4)</sup>Different capital letters mean significant differences among solvent extracts at the highest concentration (50  $\mu\text{g/mL}$ ) of RM or FRM ( $P<0.05$ ) by Tukey's HSD test.

#### DNA 손상 보호 효과(comet assay)

$\text{H}_2\text{O}_2$ 의 처리로 산화적 스트레스를 유도한 백혈구의 DNA 손상에 진주담치 시료의 보호 효과는 형광현미경으로 관찰하여 손상된 DNA를 수치화하여 Table 4에, 그 이미지는 Fig. 1에 나타내었다. 진주담치의 용매별 추출물을 1, 10, 50  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 만을 처리한 양성대조구에 비해 DNA 손상 정도가 유의적으로 감소하여 모든 시료에서 농도 의존적으로 DNA 손상 억제 효과를 확인할 수 있었다. 진주담치 추출물을 고농도의 값으로 비교했을 때



**Fig. 1.** Comet images of human leukocytes. A: negative control, B: 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated positive control, C: ethanol extracts from raw blue mussels flesh (50  $\mu\text{g/mL}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ), D: methanol extracts from raw blue mussels flesh (50  $\mu\text{g/mL}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ), E: water extracts from raw blue mussels flesh (50  $\mu\text{g/mL}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ), F: ethanol extracts from freeze-dried blue mussels flesh (50  $\mu\text{g/mL}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ), G: methanol extracts from freeze-dried blue mussels flesh (50  $\mu\text{g/mL}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ), H: water extracts from freeze-dried blue mussels flesh (50  $\mu\text{g/mL}$ )+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ).

모든 용매 추출물이 비슷한 DNA 보호 효과를 나타내어 동결건조 전후에 대한 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 진주담치의 DNA 손상 보호 활성은 동결건조의 영향을 받지 않는 것으로 나타나 동결건조에 의해 DNA 손상에 대한 보호 효과가 더 높게 나타난 미더덕과는 차이가 있는 것으로 보인다(26).

지금까지 살펴 본 진주담치(*Mytilus edulis*)의 항산화능 및 DNA 손상 보호 효과는 진주담치에 함유되어 있다고 보고된  $\beta$ -carotene, pectenolene, diatoxanthin, pectenoxanthin, mytiloxanthin, 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-dihydro- $\beta$ -carotene 등과 같은 carotenoid류와 lutein, zeaxanthin 등의 xanthophyll류 성분이 복합적으로 작용하여 나타난 것으로 사료된다(27-29). Partali 등(28)의 연구 결과에 의하면 진주담치의 carotenoid 함량이 지역별, 계절별로 다른 것으로 나타났으므로 향후 진주담치의 채취지역 및 채취시기에 따른 항산화 및 항유전독성 효능의 차이에 관한 연구가 필요한 것으로 생각된다. 또한 동결건조 처리가 진주담치의 항산화 및 DNA 손상 보호 효과에 미치는 영향을 살펴본 결과 물 추출물의 ORAC value를 제외하고는 동결건조 후에도 활성이 유지되거나 활성이 증가하는 것으로 나타났다으며, 이는 다양한 식물유래 천연자원을 대상으로 동결건조 후에도 활성이 유지되거나 오히려 더 증가했다고 보고한 연구들(30-32)과 유사한 결과이다.

## 요 약

동결건조에 의한 진주담치의 생리활성의 변화를 살펴보고자 DPPH 라디칼 소거능, ORAC, CAC 등의 항산화 활성과 comet assay를 이용한 DNA 손상 보호능을 측정하였다. 생 진주담치 및 동결건조 진주담치에서 물 추출물을 제외하여 탄올과 메탄올 추출물에서 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였고, 메탄올 추출물의 경우 동결건조에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 생 진주담치의 ORAC 수치는 물 추출물에서 가장 높게 나타난 반면, 동결건조 진주담치의 경우 메탄올 추출물에서 가장 높게 나타났다. 동결건조 후 ORAC 수치는 물 추출물에서만 유의적으로 감소된 반면 HepG2 세포의 라디칼 소거능(CAC)의 경우 물 추출물에서 유의적으로 증가하여 소거 대상 라디칼에 따라 항산화 활성의 차이가 있는 것으로 나타났다. 생 또는 동결건조 진주담치는 모든 추출물에서 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 억제하는 보호 효과가 있음이 밝혀졌고 동결건조에 의한 보호 효과는 유의적인 변화가 없는 것으로 나타났다. 결론적으로 진주담치는 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 제외하고는 모든 추출물에서 항산화 활성과 더불어 DNA 손상의 보호 효과가 관찰되었고 동결건조 가공처리에 의해서 그 활성이 크게 영향을 받지 않거나 추출물에 따라 오히려 활성이 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 우리나라에서 생산되는 진주담치의 식품 첨가물이나 기능성

식품 개발을 위한 생리활성 소재로의 가능성을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- Ji LL. 1993. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc* 25: 225-231.
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 125: 811-826.
- Halliwell B. 1995. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 49: 1341-1348.
- Kim MJ, Park E. 2012. Antioxidant and antigenotoxic effect of *Schizandra chinensis* B. extracted with water at various temperatures. *J Cancer Prev* 17: 128-140.
- Choi MJ, Kim MJ, Park EJ. 2012. Changes in the antioxidant activities and antigenotoxic effect of ethanol extracts of nine spring greens during short-term frozen storage after blanching. *J Cancer Prev* 17: 141-150.
- Ngo DH, Wijesekara I, Vo TS, Van Ta Q, Kim SK. 2011. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Res Int* 44: 523-529.
- Jung ES, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activities of extracts from parts of *Styela clava*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1674-1678.
- Lee JH, Kim GH. 2013. Evaluation of antioxidant activity of marine algae-extracts from Korea. *J Aquat Food Prod T* doi: 10.1080/10498850.2013.770809.
- Lee SH, Shin JH, Koo MO, Jung ES, Jeon GI, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2007. Antioxidant and antigenotoxic activities of extracts from anglerfish. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1229-1234.
- Park JH, Seo BY, Lee SC, Park EJ. 2010. Effects of ethanol extracts from stalked sea squirt (*Styela clava*) on antioxidant potential, oxidative DNA damage and DNA repair. *Food Sci Biotechnol* 19: 1035-1040.
- Mamelona J, Pelletier É, Girard-Lalancette K, Legault J. 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chem* 104: 1040-1047.
- Park SH. 2006. *The interesting story of oceanic organism*. Chusub, Seoul, Korea. p 164-167.
- Choi WH. 1970. Studies on the variation in chemical constituents of the sea mussel, *Mytilus edulis*. *Bull Korean Fish Soc* 3: 38-44.
- Ministry of Oceans and Fisheries. 2013. Oceans and fisheries statistics annual report. Seoul, Korea. p 137.
- Cobb CS, Ernst E. 2006. Systematic review of a marine nutraceutical supplement in clinical trials for arthritis: the effectiveness of the New Zealand green-lipped mussel *Perna canaliculus*. *Clin Rheumatol* 25: 275-284.
- Coulson S, Vecchio P, Gramotnev H, Vitetta L. 2012. Green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) extract efficacy in knee osteoarthritis and improvement in gastrointestinal dysfunction: a pilot study. *Inflammopharmacology* 20: 71-76.
- Park JH, Kim SY, Kang MG, Yoon MS, Lee YI, Park EJ. 2012. Antioxidant activity and safety evaluation of juice containing *Protaetia brevitarsis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 41-48.
- Lee EH, Ha JH, Cha YJ, Oh KS, Kwon CS. 1984. Preparation of powdered dried sea mussel and anchovy for instant soup. *Bull Korean Fish Soc* 17: 299-305.

19. Kurihara H, Fukami H, Asami S, Totoda Y, Nakai M, Shibata H. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biol Pharm Bull* 27: 1093-1098.
20. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.
21. Lautraite S, Bigot-Lasserre D, Bars R, Carmichael N. 2003. Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 7: 207-220.
22. Singh NP, 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.
23. Wang B, Li L, Chi CF, Ma JH, Luo HY, Xu YF. 2013. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chem* 138: 1713-1719.
24. Lee HJ, Kim MJ, Park JH, Park E. 2012. Antioxidative and antigenotoxic activity of white and yellow *Chrysanthemum morifolium* Ramat extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 289-294.
25. Lee HR, Hwang IW, Ha HT, Chung SK. 2013. The antioxidant capacities of imported red wines (Cabernet Sauvignon) from US and Chile. *Korean J Food Preserv* 20: 608-613.
26. Seo BY, Park JH, Park HR, Lee SC, Park EJ. 2008. Antioxidant and antigenotoxic effect of various solvent extracts from tunic, substrate and whole part of *Styela clava*. *Kyungnam Food and Biotechnology* 7: 57-63.
27. Kang DS, Ha BS. 1991. Carotenoid pigments of bivalves 1. Comparison of carotenoid pigments from muscle of mussel and blue mussel. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 369-375.
28. Partali V, Tangen K, Liaaen-Jensen S. 1989. Carotenoids in food chain studies - III. Resorption and metabolic transformation of carotenoids in *Mytilus edulis* (edible mussel). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 92: 239-246.
29. Campbell SA. 1970. The carotenoid pigments of *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Comp Biochem Physiol* 32: 97-115.
30. Orak HH, Aktas T, Yagar H, İsbilir SS, Ekinci N, Sahin FH. 2012. Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L) fruit. *Food Sci Technol Int* 18: 391-402.
31. Das A, Raychaudhuri U, Chakraborty R. 2012. Effect of freeze drying and oven drying on antioxidant properties of fresh wheatgrass. *Int J Food Sci Nutr* 63: 718-721.
32. Kumar SS, Manoj P, Shetty NP, Giridhar P. 2014. Effect of different drying methods on chlorophyll, ascorbic acid and antioxidant compounds retention of leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. *J Sci Food Agric* doi: 10.1002/jsfa.6879.