Microbiol. Biotechnol. Lett. (2015), 43(2), 105–111
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1501.01003
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

Vibrio crassostreae PKA 1002 유래 조효소액에 의한 지충이 (*Sargassum thunbergii*) 분해물의 항산화 효과

박시우[1], 김꽃봉우리[2], 김민지[2], 강보경[1], 박원민[1], 안나경[1], 최연욱[1], 박지혜[1], 배난영[1], 임성미[3], 안동현[1]*
[1]부경대학교 식품공학과/식품연구소
[2]부경대학교 수산과학연구소
[3]동명대학교 식품영양과학과

Received: January 8, 2015 / Revised: March 5, 2015 / Accepted: March 18, 2015

Antioxidant Effect of Enzymatic Hydrolysate from *Sargassum thunbergii* Using *Vibrio crassostreae* PKA 1002 Crude Enzyme

Si-Woo Bark[1], Koth-Bong-Woo-Ri Kim[2], Min-Ji Kim[2], Bo-Kyeong Kang[1], Won-Min Pak[1], Na-Kyung Ahn[1], Yeon-Uk Choi[1], Ji-Hye Park[1], Nan-Young Bae[1], Sung-Mee Lim[3], and Dong-Hyun Ahn[1]*
[1]Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea
[2]Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Republic of Korea
[3]Department of Food Nutrition and Science, Tongmyong University, Busan 608-711, Republic of Korea

An alginate degrading enzyme from the *Vibrio crassostreae* PKA 1002 strain was used to hydrolyze the water extract of *Sargassum thunbergii*. To obtain the optimum degrading conditions for the *S. thunbergii* water extract, the mixture of the water extract and enzyme was incubated at 30°C for 0, 3, 6, 12, and 24 h, and its alginate degrading ability was measured by reducing sugar and viscosity. A temperature of 30°C for a period of 6 h was found to be the optimal condition for the enhancement of the alginate's degrading ability. The pH of the enzymatic hydrolysate was not significantly different from that of the water extract. Overall lightness decreased, but redness and yellowness increased after enzymatic hydrolysis. Total phenolic compounds did not differ between the water extract and the enzymatic hydrolysate. DPPH radical scavenging activity and the reducing power of the enzymatic hydrolysate were lower than those of the water extract. However, the chelating effect of the enzymatic hydrolysate (80.08% at 5 mg/ml) was higher than that of the water extract (62.29%). These results indicate that the enzymatic hydrolysate possesses an anti-oxidant activity by way of the action of the chelating effect.

Keywords: *Vibrio crassostreae, Sargassum thunbergii,* alginate-degrading enzyme, antioxidant activity

서 론

해조류는 고압, 저온, 저산소, 고염 등의 독특한 서식환경 조건에 의하여 육상식물과 다른 2차 대사 산물을 생합성하며[6], 이런 2차 대사산물은 항균[18], 항산화[42] 및 면역증진[23] 등 다양한 기능성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 그 중 지충이(*Sargassum thunbergii*)는 갈조류의 모자반목 모자반과에 속하는 해조류로서 우리나라 연안에 걸쳐 자생하며, 어린 것은 식용 및 사료용으로 이용가능하나 주로 구충제나 퇴비로 사용되어 왔다[20]. 이러한 갈조류인 지충이는 세포벽에 점질성 물질이 함유되어 있는데 대표적으로 알긴산, 푸코이단, 라미나란 등의 점질 다당류이다. 이 중 알긴산은 독특한 물리적 성질을 지니고 있어 식품산업에서 안정제 및 증점제로 사용되고 있으며, 중금속 및 방사능 물질의 체외 배출, 콜레스테롤 저하[16], 비만 및 변비 방지 효능[34], 혈압 및 당뇨 예방 효과[37]가 있다고 알려져 있다.

이와 같은 다양한 기능성이 밝혀지면서 알긴산의 이용을 확대하기 위해 식품, 화장품 및 의료용 소재 측면에서 연구가 진행되고 있지만, 상온에서 용해시간이 길고, 농도가 높아짐에 따라 고점도 특성을 보여 산업적으로 이용하는데 제한이 따르고 있다[4]. 이에 고농도 시 고점도인 알긴산의 단점을 보완하고 이용을 확대하기 위하여 알긴산의 저분자화

***Corresponding author**
Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824
E-mail: dhahn@pknu.ac.kr
© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

연구가 진행되고 있다. 알긴산 저분자화 방법으로는 고온고압[19], 방사선 처리[4] 등의 물리적인 방법과 산과 알칼리를 이용한 화학적인 방법[40] 등이 보고되어 있으나, 해조류 유래 탄수화물의 대부분이 산이나 알칼리에 비교적 안정하여 저분자화 및 유효성분 분리에 어려움이 있다. 따라서 최근에는 이러한 방법 이외에 알긴산 분해효소를 이용한 저분자화 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 기존의 가수분해효소를 이용한 저분자화 연구는 상업용 정제효소를 이용하여 저분자화 시키는데 이는 가격이 비싸고 대량의 산업적 적용에는 어려움이 따른다[12, 22].

현재까지 진행된 지충이 관련 연구를 살펴보면 지충이 에탄올 추출물의 lipase, α-amylase 저해 활성[13, 28], 항균 활성[29], 지충이 용매 추출물의 항산화 활성[5] 등 일반적으로 유기용매를 이용한 추출 후 생리활성을 측정한 연구가 대부분이며, 지충이에 효소를 이용한 추출 및 추출물의 생리활성을 증진시키기 위하여 추출물에 효소처리를 통한 생리활성 증진에 대한 연구는 없는 실정이다.

본 연구에서는 지충이 물 추출물에 사멸기에 접어들어 분해중인 해조류로부터 분리된 *Vibrio crassostreae* PKA 1002 균주로부터 생산되는 알긴산 분해 조효소를 이용하여 지충이 물 추출물의 알긴산을 저분자화시켰을 때 항산화 활성 증진에 대해 알아보고 이의 산업적 이용가능성에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 지충이는 부산 기장에서 채취한 것을 담수로 수세한 후 동결건조하여 분쇄한 시료를 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

물 추출물 및 조효소액의 제조

물 추출물의 제조는 지충이 분말에 10배량의 증류수를 가한 후 실온에서 shaker (H0802, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 180 rpm에서 24시간 추출한 후 원심분리기(Combi 514R, Hanil Science Co., Seoul, Korea)로 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 모은 후 잔사에 다시 10배량의 증류수를 가하여 2회 반복 추출하였다. 상층액은 여과지(Advantec 5A, Advantec MFS, Tokyo, Japan)로 여과하여 37°C에서 rotary evaporator (RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)로 농축시켜 사용하였다. 조효소액의 제조는 2% NaCl이 첨가된 marine broth (MB, BD Difco, Detroit, MI, USA) 배지를 pH 9로 조정한 후 *V. crassostreae* PKA 1002 균주[38]를 접종하고 30°C, 24시간 배양한 후, 원심분리기(SUPRA 22K, Hanil Science Co.)로 4°C, 10,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 얻은 상층액을 조효소액으로 하였다.

효소분해물 제조 및 활성측정

지충이 물 추출물을 2.5% NaCl이 첨가된 10 mM phosphate buffer (pH 7.3)를 이용하여 40 mg/ml 농도로 제조하였다. 제조한 지충이 물 추출물을 *V. crassostreae* PKA 1002 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 혼합하여 30°C에서 0, 3, 6, 12 및 24시간 동안 반응시킨 후 환원당과 점도를 측정하여 최적 분해 조건을 확인하였으며, 이 때 사용한 조효소액의 활성은 304 U/ml이었다.

환원당은 Somogyi-Nelson 법[32]으로 520 nm에서 표준당(glucose)으로 작성한 검량곡선으로부터 환원당 함량을 측정하였으며, 점도 측정은 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 이용하여 Stevens와 Levin[36]의 방법을 참고하여 25°C, 6 rpm, 40 cP spindle을 이용하여 측정하였다.

pH 및 색도 측정

pH의 측정은 지충이 물 추출물과 효소분해물을 pH meter (HM-30V, TOA, Kobe, Japan)로 측정하였다. 색도의 측정은 지충이 물 추출물과 효소분해물을 액체시료용 cell에 취한다음 색차계(JC801, Color Technosystem Co., Tokyo, Japan)로 L^*, a^*, b^* 값으로 색도를 측정하였다. 이때 사용된 표준백판의 값은 $L^* = 93.73$, $a^* = -0.12$, $b^* = 0.11$이었다. 지충이 물 추출물의 경우, 증류수를 1:1 비율로 혼합하여 위의 실험을 진행하였다.

Total polyphenol compounds (TPC) 측정

총 폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis 법[39]을 변형하여 측정하였다. 초순수 6.5 ml에 시료 0.5 ml을 가하여 Folin-Ciocalteu's 용액 0.5 ml을 혼합한 후 3분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 무수 탄산나트륨 포화용액 1 ml을 첨가하고 전체가 10 ml이 되도록 초순수를 가하여 상온에서 1시간 방치시킨 후 UV/visible spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Richester, NY, USA)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 하여 동일한 방법으로 작성된 표준곡선으로부터 총 페놀화합물의 함량을 정량하였다.

DPPH radical scavenging activitiy

DPPH 라디칼 소거능은 Blois[1]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 ml에 0.2 mM DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액을 0.5 ml 분주하여 30분간 방치시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료대신 용매를 가하여 동일한 방법으로 측정하였다. 또한 시료 자체의

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1501.01003

색에 대한 흡광도 값을 보정해주기 위해 0.2 mM DPPH 대신에 증류수를 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

Chelating effect 측정

금속 봉쇄력은 Shimada 등[35]의 방법을 따라 측정하였다. 시료 0.2 ml에 증류수 0.74 ml을 첨가하고 2 mM의 iron (II) chloride 용액 0.02 ml과 5 mM의 ferrozine 용액 0.04 ml을 첨가한 다음 실온에서 20분 반응시킨 후 UV/visible spectrophotometer로 562 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조구는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 또한 색소에 의한 흡광도를 보정해주기 위하여 공시험은 시료를 같은 농도로 희석하여 흡광도를 측정하였다.

Reducing power 측정

환원력은 Oyaizu [33]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 ml에 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 ml을 가하여 충분히 혼합한 후 50°C water bath에서 20분 반응시킨 후 10% TCA 용액 2.5 ml을 첨가하고 3,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리 하였다. 이 상층액 2 ml에 증류수 2 ml와 0.1% iron (III) chloride 용액 0.4 ml을 가해 혼합한 다음 UV/visible spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 나타내었다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 SAS program (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분산 분석한 후 Duncan의 다중검정법 및 t-test 검정을 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 항목들 간의 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

점도 및 환원당의 변화

지층이 물 추출물과 *V. crassostreae* PKA 1002 조효소액을 혼합하여 0, 3, 6, 12 및 24시간 반응시킨 후 시료의 환원당 생성능 및 점도의 변화를 살펴본 결과(Table 1), 환원당의 변화는 지층이 물 추출물과 조효소액 반응 6시간에서 357.82 μg/ml으로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었다. 점도의 변화는 초기 0시간에서 1.57 cP이였으며 반응시간이 길어질수록 유의적으로 감소하여, 반응 6시간에서 1.22 cP로 가장 낮았다. 반응 12 및 24시간에서는 6시간과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 조효소액과 혼합한 물 추출물을 30°C에서 6시간 반응 시 환원당의 생성량이 가장 높았으며 점도의 감소가 가장 낮음을 확인하여 최적의 알긴산 분해조건임을 확인하였다. 이 후 생리활성 실험은 30°C, 6시간 분해한 지층이 효소분해물을 이용하여 진행하였다.

Table 1. Effect of time on *Sargassum thunbergii* water extract-degrading activity of crude enzyme.

Time (h)	Reducing sugar (μg/ml)	Viscosity (cP)
0	313.56±0.11$^{b1)}$	1.57±0.02^{a}
3	316.14±0.55^{b}	1.42±0.02^{b}
6	357.82±2.58^{a}	1.22±0.01^{c}
12	310.15±2.23^{b}	1.23±0.03^{c}
24	309.39±3.25^{b}	1.30±0.03^{c}

[1)]Means in the same column (a-c) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's test ($p < 0.05$).

Table 2. pH value and chromaticity of *Sargassum thunbergii* water extract treated with crude enzyme.

	Water extract	Enzymatic hydrolysate
pH	6.11±0.00$^{NS1)}$	6.15±0.01
L^*	43.84±0.00$^{a2)}$	38.52±0.03^{b}
a^*	8.45±0.06^{b}	10.65±0.13^{a}
b^*	50.52±0.25^{b}	62.42±0.05^{a}

[1)]Not significant.
[2)]Means in the same row (a-b) bearing different superscript in samples are significantly different by t-test ($p < 0.05$).

pH 및 색도

지층이 물 추출물 및 효소분해물의 pH 및 색도를 측정한 결과(Table 2), 지층이 물 추출물 및 효소분해물의 pH는 각각 6.11 및 6.15으로 약산성이며 두 시료간 유의적인 차이는 보이지 않았다. 색도는 물 추출물 및 효소분해물의 명도가 43.83 및 38.52, 적색도가 8.45 및 10.65, 황색도가 50.52 및 62.42로 측정되었다. 조효소액과 반응시킴으로써 명도가 감소하고 적색도 및 황색도가 증가하는 것으로 나타났다. 이상으로 조효소액 반응에 의해 pH는 크게 변화하지 않았으며, 색도는 조효소액 첨가에 의해 명도는 감소하고 적색도와 황색도는 증가한 것으로 보인다.

Total polyphenol compounds

페놀화합물은 구조식에 hydroxyl기를 가지고 free radical들과 쉽게 수소교환 반응을 일으켜 공명 안정화될 수 있는 구조를 가지고 있어 많은 페놀화합물들이 항산화 활성을 가지는 것으로 보고되고 있다[17]. 지층이 물 추출물 및 효소분해물의 총 폴리페놀 화합물(TPC)의 양을 측정한 결과

Table 3. Total polyphenol contents of *Sargassum thunbergii* water extract treated with crude enzyme.

(Unit: mg/g of dry sample)

	TPC
Water extract	2.54 ± 0.01^{NS}
Enzymatic hydrolysate	2.55 ± 0.05

NS: Not significant.

(Table 3), 지충이 물 추출물의 경우 2.54 mg/g, 효소분해물의 경우 2.55 mg/g으로 유의적인 함량의 차이는 보이지 않았다. Lee 등[27]의 감태 줄기 및 잎의 효소적 추출물의 TPC 함량은 탄수화물 분해효소 5종에서 줄기와 잎이 각각 1,418–1,514 및 1,734–2,029 mg/100 g으로 보고하였고, Lee 등[25]의 연구에서 청각의 효소가수분해에 따른 TPC 함량을 측정한 결과 탄수화물 분해효소 7종류를 사용한 경우, 1.44–13.34 mg/ml으로 분해하는데 사용된 효소에 따라 TPC 함량이 달랐다고 보고하였다. Heo 등[11]의 지충이 물 추출물의 TPC 함량이 21.71 mg/g으로 보고하고 있어, 본 실험의 TPC 함량의 결과와는 차이를 보이는 것을 확인하였는데, 해조류의 TPC 함량은 종류, 추출 조건과 방법에 따라 차이가 있는 것으로 사료되며, 일반적으로 해조류는 지리적 위치, 계절과 성장조건, 성장 정도 등에 따라서 그 성분 및 생리활성이 다르게 나타날 수 있는 것으로 알려져 있다[24].

DPPH radical 소거능

항산화 활성 측정법은 항산화 물질인 phenolic compound와 aromatic amine 화합물 등에 의해서 free radical이 환원되는 성질을 이용하여 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있으며, 그 중 DPPH는 수소를 공여 받아 환원되어 짙은 자색이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 흡광도를 측정하여 간단히 항산화 활성을 측정할 수 있어 항산화 활성 측정에 가장 많이 쓰이는 방법이다[14, 30].

지충이 물 추출물 및 효소분해물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과(Table 4), DPPH radical 소거능은 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005 mg/ml 농도에서 물 추출물이 94.21, 90.13, 64.92, 23.33, 13.33, 3.03%를 보였으며, 효소분해물이 88.06, 72.03, 47.62, 28.98, 10.34, 2.03% 효과를 보여 효소분해물이 물 추출물보다 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 가지는 것을 확인하였다.

Heo 등[11, 12]의 연구에서 큰잎모자반 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거능이 2 mg/ml 농도에서 87.11%를 보인 반면, 당분해효소인 viscozyme과 cellulclast 처리하여 제조한 효소분해물의 DPPH 라디칼 소거능이 28.41 및 33.79%의 활성을 보였다고 보고하여 효소분해물의 DPPH 라디칼 소거능이 물 추출물에 비하여 낮은 것으로 나타났으며, 이는 본 실험의 결과와 유사한 결과임을 확인할 수 있었다. 해조류 추출물의 항산화력은 어떤 단일 성분이 아니라 여러 성분이 복합적으로 존재함으로써, 상승효과 및 보호효과가 나타난다고 보고하고 있어, 조효소액 처리에 의한 저분자화된 물질 및 기타 조효소액에 함유되어 있는 성분 등에 의하여 DPPH 라디칼 소거능이 차이를 보이는 것으로 사료된다[3].

Chelating effect

Fe^{2+}와 같은 금속 이온은 세포 내에서 산화제의 구성에 중요한 역할을 한다. 따라서 Fe^{2+}와 같은 금속이온의 적절한 제거는 세포 내에서 산화제 생성을 억제할 수 있으며, 또한 Fe^{2+}는 체내에서 지질과산화물의 분해를 촉진하며, 이 분해산물은 인체에 유해한 작용을 한다고 알려져 있다[7, 10]. Fe^{2+} 이온은 ferrozine과 반응하여 보라색 복합체를 형성하는데, 시료 중에 항산화 성분이 있으면 ferrozine과 경쟁적으로 반응하여 Fe^{2+}-ferrozine 복합체의 생성을 억제하고 보라색이 줄어든다. 따라서 보라색의 감소 정도를 흡광도로 측정하여 금속 봉쇄력을 나타낼 수 있다[9].

지충이 물 추출물 및 효소분해물의 금속이온 chelating 효과를 측정한 결과(Table 5), 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005 mg/ml 농도에서 물 추출물이 62.29, 24.36, 14.69, 4.09, 2.44, 0.60%를 보였으며, 효소분해물이 80.08, 57.80, 36.61, 10.95, 6.35, 0.48% 효과를 나타내었다. 금속이온 chelating 효과는 0.05–5 mg/ml 농도까지는 지충이 물 추출물보다 효소분해물이 유의적으로 높은 chelating효과를 보였으며, 0.005 mg/ml 농도에서는 두 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 물 추출물에 조효소액을 처리하여 저분자

Table 4. DPPH radical scavenging effects of *Sargassum thunbergii* water extract treated with crude enzyme.

(Unit: %)

	Concentration (mg/ml)					
	0.005	0.05	0.1	0.5	1	5
Water extract	3.03 ± 0.35$^{b1)}$	13.33 ± 0.27^{b}	23.33 ± 0.80^{c}	64.92 ± 0.61^{b}	90.13 ± 0.81^{b}	94.21 ± 0.46^{b}
Enzymatic hydrolysate	2.03 ± 0.25^{b}	10.34 ± 0.13^{c}	28.98 ± 0.38^{b}	47.62 ± 0.63^{c}	72.03 ± 0.13^{c}	88.06 ± 0.69^{c}
Ascorbic acid	21.26 ± 1.43^{a}	95.69 ± 0.12^{a}	95.86 ± 0.25^{a}	95.54 ± 0.10^{a}	95.69 ± 0.25^{a}	96.74 ± 0.28^{a}

[1)]Means in the same column (a-c) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's test ($p < 0.05$).

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1501.01003

Table 5. Chelating effects of *Sargassum thunbergii* water extract treated with crude enzyme.

(Unit: %)

	Concentration (mg/ml)					
	0.005	0.05	0.1	0.5	1	5
Water extract	0.60±0.48^{b}	2.44±0.43^{c}	4.09±0.48^{c}	14.69±0.83^{c}	24.36±0.39^{c}	62.29±0.17^{c}
Enzymatic hydrolysate	0.48±0.67^{b}	6.35±0.34^{b}	10.95±1.49^{b}	36.61±2.44^{b}	57.80±3.71^{b}	80.08±0.07^{b}
EDTA	11.98±2.65^{a}	99.53±0.00^{a}	99.38±0.14^{a}	99.38±0.07^{a}	99.06±0.31^{a}	99.96±0.05^{a}

[1)]Means in the same column (a-c) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's test ($p < 0.05$).

화를 유도하였을 때, 지충이 물 추출물보다 효소분해물의 chelating 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

Ko 등[22]의 갈조류 큰잎모자반의 당 분해효소 celluclast 추출물이 2 mg/ml 농도에서 48.88%의 chelating 효과를 보였다고 하였다. 또한, Lee 등[26]의 미세조류인 *Amphora coffeaeformis*의 ferrous chelating 효과가 2 mg/ml 농도에서 75.60%를 보였으며 이는 매우 높은 ferrous chelating 효과라고 보고하고 있어, 본 실험의 효소분해물이 1 mg/ml 농도에서 57.80% 효과를 보여 지충이 효소분해물의 chelating 효과가 뛰어남을 확인하였다. 해조류의 항산화 활성은 phenolic 화합물 이외에 저분자 polysaccharides, 색소, 단백질과 펩타이드 등의 영향으로 효과를 보인다고 알려져 있는데[2, 31, 41], 본 실험의 효소분해산물의 다당류가 저분자화되면서 생성된 저분자 polysaccharide 물질 및 조효소액내의 단백질 등에 의하여 지충이 효소분해물의 chelating 효과가 우수하게 나타난 것으로 사료된다.

Reducing power

Reducing power는 Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온으로 환원시키는 원리를 이용하여 전자의 공여 능력을 측정하는 것으로, 금속이온의 환원력을 측정한 흡광도 수치는 그 자체가 시료의 환원력을 나타내므로 높은 흡광도 수치를 보일수록 높은 환원력을 나타낸다고 할 수 있다[5]. 지충이 물 추출물 및 효소분해물의 환원력을 측정한 결과(Table 6), 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005 mg/ml 농도에서 물 추출물이 0.510, 0.146, 0.085, 0.033, 0.026, 0.022를 보였고, 효소분해물이 0.433, 0.129, 0.067, 0.034, 0.024, 0.024의 효과를 보임을 확인하였다. 환원력은 5 mg/ml 농도에서는 두 처리구 중 물 추출물 처리구에서 유의적으로 높은 환원력을 보였고, 0.005–1 mg/ml 농도에서는 두 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 Kim 등[21]의 미역 열수추출물의 환원력 측정결과, 5 mg/ml 농도까지 환원력이 거의 나타나지 않았으며, 10 mg/ml과 100 mg/ml 농도에서 각각 0.06, 0.19을 보인다고 하였고, Lee 등[25]은 청각의 당 분해효소 promozyme 효소분해물의 환원력이 1 mg/ml 농도에서 약 0.25로 매우 높은 환원력을 나타냈다고 보고하고 있어, 본 실험의 결과와 유사한 결과를 확인하였다. 환원력은 항산화 활성과 밀접한 관계를 가지며 환원력은 일반적으로 reductone의 존재와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 환원력의 반응조건에 첨가되는 시료의 농도나 추출 용매의 종류 및 시료의 특성에 따라 환원력의 차이가 상이하게 나타나는 것으로 알려져 있다[8, 15].

요 약

지충이 물 추출물을 알긴산 분해능을 가진 *V. crassostreae* PKA 1002 유래 조효소액을 이용하여 가수분해시킨 후 pH, 색도 및 항산화 활성의 변화를 살펴보았다. 지충이 물 추출물과 조효소액을 30°C에서 0, 3, 6, 12 및 24시간 반응시켜 환원당 생성능과 점도의 변화를 살펴본 결과, 환원당 생성능은 반응 6시간에서 357.82 μg/ml로 가장 높아졌으며, 점도는 0시간에서 1.57 cp에서 반응 6시간에서 1.22 cP로 가장 낮아져 6시간에서 최적분해 조건임을 확인하였다. 최적 조건에서 pH 및 색도는 지충이 물 추출물과 효소분해물이 각각 6.11과 6.15로 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 색도는

Table 6. Reducing power of *Sargassum thunbergii* water extract treated with crude enzyme.

(Unit: Absorbance at 700 nm)

	Concentration (mg/ml)					
	0.005	0.05	0.1	0.5	1	5
Water extract	0.022±0.003$^{a1)}$	0.026±0.006^{b}	0.033±0.004^{b}	0.085±0.005^{b}	0.146±0.004^{b}	0.510±0.020^{b}
Enzymatic hydrolysate	0.024±0.007^{a}	0.024±0.009^{b}	0.034±0.006^{b}	0.067±0.021^{b}	0.129±0.005^{b}	0.433±0.002^{c}
Ascorbic acid	0.027±0.001^{a}	0.097±0.002^{a}	0.176±0.001^{a}	0.937±0.001^{a}	1.944±0.008^{a}	2.186±0.009^{a}

[1)]Means in the same column (a-c) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's test ($p < 0.05$).

효소분해물이 물 추출물보다 명도는 감소하고 적색도 및 황색도는 모두 증가하는 것을 확인하였다. TPC 함량은 지충이 물 추출물과 효소분해물이 2.54 및 2.55 mg/g으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. DPPH 라디칼 소거능 측정 결과, 지충이 효소분해물이 0.05–5 mg/ml 농도에서 물 추출물보다 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 반면, chelating effect 측정 결과, 0.05–5 mg/ml 농도에서 효소분해물의 활성이 물 추출물보다 유의적으로 높아짐을 확인하였다. Reducing power 측정 결과, 0.005–1 mg/ml 농도에서 지충이 물 추출물과 효소분해물간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 지충이 효소분해물은 지충이 물 추출물보다 금속봉쇄력의 활성이 증진됨을 확인하여, 주로 DPPH 라디칼 소거능에서 항산화 활성을 나타낸 지충이 물 추출물과 달리 금속봉쇄력 작용에 의해 항산화 활성을 나타냄을 확인하였다.

Acknowledgments

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2014 year : 20140356).

References

1. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1990-2100.
2. Burtin P. 2003. Nutritional Value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2**: 498-503.
3. Cho EK, Kang SH, Choi YJ. 2013. Biological analysis of enzymatic extracts from *Sargassum fulvellum* using polysaccharide degrading enzyme. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **28**: 349-355.
4. Cho M, Kim BY, Rhim JH. 2003. Degradation of alginate solution by using γ-irradiation and organic acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 67-71.
5. Choi SY, Kim SY, Hur JM, Choi HG, Sung NJ. 2006. Antioxidant activity of solvent extract from *Sargassum thunbergii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 139-144.
6. Fenical W. 1983. Marine plants: a unique and unexplored resource. In Plants: The potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals (workshop proceedings). pp147-153. DIANE publisher, Washington DC, USA.
7. Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 97-112.
8. Fu HY, Shieh DE, Ho CT. 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *J. Food Lipids* **9**: 35-46.
9. Gulcin I, Berashvili D, Gepdiremen A. 2005. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *J. Ethnopharmacol.* **101**: 287-293.
10. Halliweill B. 1991. Reactive oxygen species in living systems : source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* **91**: 14-19.
11. Heo SJ, Cha SH, Lee KW, Cho SK, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju island. *Algae* **20**: 251-260.
12. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour. Technol.* **96**: 1613-1623.
13. Kim DH, Kim KBWR, Kim MJ, Sunwoo C, Jung SA, Kim HJ, *et al*. 2012. Effect of heat, pH, and gamma irradiation treatments on lipase inhibitory activity of *Sargassum thunbergii* ethanol extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **41**: 566-570.
14. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 333-338.
15. Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. 2003. Antioxidative activity and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants (*Akenia quinate Decaisn, Scirusfluviatilis A. Gray, Gardenia Jasminoides for. grandiflora Makino*). *J. Agric. Life Sci.* **37**: 69-75.
16. Kim KH, Cheong JJ. 1984. Optimum conditions for extracting alginic acid from and amino acid composition of its extraction residue. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**: 336-340.
17. Kim MR, Kim JH, Wi DS, Na JH, Sok DE. 1999. Volatile sulfur compounds, proximate components, minerals, vitamin C content and sensory characteristics of the juices of kale and broccoli leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 1201-1207.
18. Kim MS, Kwon KJ, Lee MJ, Ahn SM, Sohn HY. 2012. Evaluation of the antimicrobial activities of 35 seaweed extracts against pathogenic bacteria and Candida sp. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 144-151.
19. Kim OJ, Lee DG, Lee SM, Lee SJ, Do HJ, Park HJ, *et al*. 2010. Isolation and characteristics of alginate-degrading *Methylobacterium* sp. HJM27. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 144-150.
20. Kim YS, Choi HG. 2004. Epiphytic algae growing on *Sargassum thunbergii* in southern and western coast of Korea. *J. Ecol. Environ.* **27**: 173-177.
21. Kim YS, Nam HG, Shin HJ, Na MS, Kim MH, Lee CW, *et al*. 2011. Effect of hot water extract of *Undaria pinnatifida* on the activities of antioxidant and nitrite scavenging. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **26**: 151-156.
22. Ko SC, Kang SM, Ahn G, Yang HP, Kim KN, Jeon YJ. 2010. Antioxidant activity of enzymatic extracts from *Sargassum coreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 494-499.
23. Lee CJ, Song EJ, Kim KBWR, Jung JY, Kwak JH, Choi MK, *et al*. 2011. Effect of gamma irradiation on immune activity and physicochemical properties of *Myagropsis myagroides* water extract. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **44**: 50-57.
24. Lee HB, Choi BW, Chun JH, Yu BS. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **7**: 1067-1077.
25. Lee KH, Senevirathne M, Ahn CB, Je JY. 2010. Biological compounds extracted from *Codium fragile* by enzymatic

hydrolysis and their biological activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 953-959.
26. Lee SH, Karawita R, Affan A, Lee JB, Lee KW, Lee BJ, *et al*. 2009. Potential of benthic diatoms *Achnanthes longipes, Amphora coffeaeformis* and *Navicula* sp. (Bacillariophyceae) as antioxidant sources. *Algae* **24**: 47-55.
27. Lee SH, Kim KN, Cha SH, Ahn GN, Jeon YJ. 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.
28. Lee SJ, Song EJ, Kim KBWR, Lee CJ, Jung JY, Kwak JH, *et al*. 2010. Inhibitory effects of *Sargassum thunbergii* ethanol extract against α-amylase. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 648-653.
29. Lee SY, Song EJ, Kim KBWR, Yoon SY, Kim SJ, Lee SJ, *et al*. 2009. Antimicrobial activity of ethanol extract from *Sargassum thunbergii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 502-508.
30. Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **9**: 29-35.
31. Nardella A, Chaubet F, Boisson-Vidala C, Blondina C, Durandb P, Jozefonvicza J. 1996. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.* **289**: 201-208.
32. Nelson N. 1994. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
33. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**: 307-315.
34. Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T. 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypersensitive rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 6245-6252.
35. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulson. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 945-948.
36. Stevens RA, Levin RE. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 896-899.
37. Suetsuna K, Kaekawa K, Chen JR. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* wakame peptide on blood pressure in spontaneously hypersensitive rats. *J. Nutr. Biochem.* **15**: 267-272.
38. Sunwoo C, Kim KBWR, Kim DH, Jung SA, Kim HJ, Jeong DH, *et al*. 2012. Optimization of conditions for the production of alginate degrading crude enzyme from *Vibrio crassostreae* PKA 1002. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 243-249.
39. Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.–The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agr.* **10**: 63-68.
40. Uo MH, Joo DS, Cho SY, Min TS. 2006. Purification and characterization of the extracellular alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **53**: 246-252.
41. Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 605-607.
42. Yoon SY, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Lee SJ, Lee CJ, *et al*. 2010. Antimicrobial activity of the *Sargassum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 155-159.