Microbiol. Biotechnol. Lett. (2016), 44(4), 452–460
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1609.09002
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

함초 씨의 항균, 항산화 및 항혈전 활성

김미선[1], 김득회[2], 손호용[1]*
[1]안동대학교 식품영양학과
[2]파이토코퍼레이션

Received: September 8, 2016 / Revised: October 24, 2016 / Accepted: October 25, 2016

Antimicrobial, Antioxidant, and Anticoagulation Activities of *Salicornia europaea* seeds

Mi-Sun Kim[1], Deuk Hoi Kim[2], and Ho-Yong Sohn[1]*
[1]*Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Republic of Korea*
[2]*Research Center, Phyto Corporation, Seoul 08826, Republic of Korea*

This study was designed to develop a functional pharma-food using *Salicornia europaea* (SE). Tiny seeds from the mature SE were collected, and their biological activities were evaluated. The extraction yield of the seed in hot water was found to be 29.6% and the hot water extract (HWE) contained 25.7 mg/g total polyphenol (TP) and 11.5 mg/g total flavonoid (TF), which are similar to those contained in leaf and stem of SE. Among the subsequent organic solvent fractions, the ethylacetate (EA) fraction exhibited the highest content of TP (158.3 mg/g), TF (136.2 mg/g), and total sugar (228.3 mg/g). The EA fraction exhibited broad-range antibacterial activities against gram-positive bacteria, and the butanol fraction exhibited growth inhibitory effect against only *Staphylococcus epidermidis*. An antioxidation activity assay of the HWE and its fractions showed the EA fraction to have the highest radical scavenging activity with RC_{50} values of 57.0, 29.0, and 28.9 μg/ml against DPPH anion, ABTS cation, and nitrite, respectively. The RC_{50} values of vitamin C against DPPH anion, ABTS cation, and nitrite were 10.7, 4.0, and 18.0 μg/ml, respectively, indicating that the EA fraction of SE has potent antioxidant compounds. In an anticoagulation assay, the EA fraction exhibited a 15-fold extended thrombin time at 5 mg/ml and activated partial thromboplastin time at 7 mg/ml, which are comparable to the activities of aspirin. The HWE and its fractions had no hemolysis activities against human RBCs at up to 1 mg/ml. These results suggest that the EA fraction from SE has a great potential as a new antibacterial and anticoagulation agent.

Keywords: **Anti-microbial, anti-oxidation, anti-thrombosis, seed, *Salicornia europaea***

서 론

함초(*Salicornia europaea*)는 갯벌, 염전에 서식하는 명아주과의 식물로 줄기 마디가 통통하고 튀어나온 모양을 하여, 국내에서는 퉁퉁마디로도 불리며[6], 전체 모양이 산호를 닮았다 하여 산호초, 신초, 복초, 염초라고 불린다[2]. 소금을 함유한 풀, 즉 함초라 명명될 만큼 4–6%의 염분을 함유하고 있어 특유의 짠맛을 나타내어, 식물성 소금 제조 및 다양한 음식 부재료로 이용되고 있다[9]. 특히 함초는 염전에 서식하면서 Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Zn^{++} 등 다양한 미네랄을 풍부하게 함유하고 있으며, 염 스트레스에 대응하는 betaine과 같은 양쪽성 물질을 고농도로 함유하고 있다[19]. 또한 식이섬유 함량이 60.6% 이상이며[29], 전체 지방산의 50%가 리놀렌산, 전체 아미노산의 40% 이상이 필수아미노산으로 알려져 우수한 영양성이 보고되어 있으며[8], 한방 및 민간에서는 변비, 소화불량, 간염 및 신장병 치료제로 사용되어 왔다[21].

최근에는 함초 줄기 및 잎의 지상부 추출물 및 함초 발효물에서 다양한 유용 생리활성이 보고되고 있으며, 항산화[3, 4, 8, 11, 31], 항피로[3], 항당뇨[9], 항염증[7], 혈전생성억제 및 혈전용해 활성[8, 31], 비만 억제[11, 13], 면역능 증강[27], 고지혈증[13], 간기능 개선[9, 26], 암세포 성장억제[28],

***Corresponding author**
Tel: +82-54-820-5491, Fax: +82-54-820-6271
E-mail: hysohn@anu.ac.kr
© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

배변촉진[5] 및 여드름 피부 개선 활성[18, 25] 등이 보고되면서, 함초 수요가 폭발적으로 증가하고 있는 실정이다. 이러한 함초의 관심 증가에 따라 국내에서는 서해안 지역의 해안가를 중심으로 함초 재배가 빠르게 확대되고 있다. 함초는 통상 2–3월에 파종하여 5–6월에 부드러운 지상부를 1차 수확하며, 이는 샐러드 등의 식용으로 이용된다. 이후 9월 말부터 10월 중순경에 성장이 완료된 함초를 수확하며, 이때는 줄기와 가지가 녹색에서 붉은 색으로 변하게 되며[32], 이 시기 함초는 거친 식감으로 인해 식용보다는 약용으로 사용된다. 함초는 줄기 끝에 둥글고 납작한 미세 씨앗을 다량 매달고 있으며, 성숙기의 함초는 가볍게 털어내는 작업으로도 다량의 씨앗을 회수할 수 있다. 함초 씨앗은 통상 2,200여개가 1 g에 해당할 만큼 매우 가볍고 작은 특성을 가지고 있으며, 4% 염수에 침지하는 경우 발아하는 특징이 있다.

함초 줄기와 잎을 대상으로 한 지속적인 연구에서 함초의 다양한 유용 생리활성 발굴 및 quercetin, rutin, isorhamnetin 등의 flavonoids [12], gypsogenin 3-O-b-D-glucuronopyranoside 등의 triterpenoid saponins [18], pentadecyl ferulate [35] 등이 알려져 있으나, 현재까지 함초씨의 성분 및 생리활성은 최근의 nitrite 소거능 및 acetylcholine esterase 저해활성만이 보고[23]되어 있을 뿐 전 세계적으로도 보고된 바 없는 실정이다. 본 연구에서는 함초를 이용한 고부가가치 식의약 소재 개발 연구의 일환으로 현재 별도의 용도가 알려져 있지 않은 함초씨를 대상으로 열수 추출물과 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 다양한 생리활성을 평가하였으며, 그 결과 함초 씨의 강력한 항균, 항산화 및 항혈전 활성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 함초는 2015년 10월 초순 전남 신안의 함초 재배농가에서 수확한 씨를 구입하여 사용하였다. 열수 추출물 제조를 위해서는 함초 씨에 대해 10배의 증류수를 가하고 100℃에서 1시간 가열 추출한 후 방냉하고, 다시 상기 과정을 2회 반복한 후 추출액을 모아 filter paper (Whatsman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)하여 분말로 조제하였다[15]. 이후, 조제시료는 증류수에 현탁한 후, hexane, ethylacetate (EA), butanol로 순차적 분획하였으며, 최종적으로 물 잔류물을 회수하였다. 조제된 함초 씨 시료들은 DMSO 또는 증류수에 적당한 농도로 녹여, 성분분석, 항균활성, 항산화 활성, 혈액응고 저해, 혈소판 응집저해 및 적혈구 용혈활성 평가에 사용하였다. 실험에 사용한 함초 씨 시료는 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2015-SE-SEED1~5).

항균 활성

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 항균 활성은 기존의 보고된 방법과 동일하게 평가하였다[14]. 항균 활성평가를 위한 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, *Bacillus subtilis* KCTC 1924를, 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Salmonella Typhimurium* KCTC 1926, 진균으로는 *Candida albicans* KCTC 1940 및 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233를 사용하였다. 항세균 활성 평가의 경우, Nutrient broth (Difco Co., USA)에 각각의 세균을 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양한 후, 각 균주를 $O.D._{600}$ 0.1로 조정하여 Nutrient agar (Difco Co., USA) 배지를 포함하는 멸균 petri dish (90 × 15 mm, Green Cross Co., Ltd., Korea)에 100 μl 도말하고, 각각의 시료 5 μl를 멸균 disc-paper (지름 6.5 mm, Whatsman No.2)에 가하여, 37℃에서 24시간 동안 배양하였으며, 진균 경우에는 Sabouraud dextrose (Difco Co., USA)를 이용하여 동일한 방법으로 30℃에서 24시간 동안 배양 후, 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다[14]. 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole (Sigma Co., USA)을 각각 1 μg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

항산화 활성

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성은 기존의 보고[14]한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 음이온 소거능(DSA, DPPH Scavenging Activity), ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 양이온 소거능 (ASA, ABTS Scavenging Activity, Nitrite 소거능 (NSA, Nitrite Scavenging Activity) 및 환원력 측정으로 평가하였으며, 최종 항산화 활성의 비교는 RC_{50} (표준조건에서 활성 radical을 50% 제거하는 데 소요되는 시료의 양)으로 나타내었다. 이때 활성 대조구로는 vitamin C (Sigma Co.)를, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다.

혈액응고 저해활성

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 혈액응고 저해활성은 시료의 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하여 평가하였다[16]. 혈장은 시판 control plasma (MD Pacific

Technology Co., Ltd., China), PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD Pacific Technology Co., Ltd., China)의 분석시약을, 기타 시약은 시약급 이상으로 Sigma Co. (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다[17]. 각각의 혈액응고활성은 3회 반복 측정하였으며, thrombin, prothrombin 및 혈액응고인자 저해활성은 시료 첨가시의 TT, PT 및 aPTT의 평균값을 용매 대조구인 DMSO 첨가시의 TT, PT 및 aPTT 평균값의 비로 각각 나타내었다[17]. 이때 시료 대조군으로는 aspirin (Sigma Co., USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다.

혈소판 응집 저해 활성

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 혈소판 응집저해 활성은 혈소판이 미세전극에 부착, 응집됨에 따라 발생하는 전기저항값의 변화를 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, USA)를 사용하여 측정하였다[33]. 먼저 10 mM $CaCl_2$ 50 μl, suspending buffer 147.5 μl, 함초 씨 시료 5 μl가 포함된 반응 cuvette에 50 μl의 인간 혈소판(5×10^8 cells/ml)을 넣은 후 3분 동안 37℃로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml) 2.5 μl를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며, 응집곡선의 area under 값을 구하였다. 함초 추출물의 혈소판 응집도는 시료 첨가시의 area under 값과 용매대조구인 DMSO 첨가시의 area under 값의 비를 백분율로 나타내었다[14, 16].

인간 적혈구 용혈 활성 평가

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 세포독성은 인간 적혈구 용혈 활성을 측정하여 평가하였다. 먼저 PBS로 3회 수세한 인간 적혈구(4%) 100 μl를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100 μl를 가한 다음 37℃에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리($450 \times g$)하여 상등액 100 μl를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다[17]. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 활성 대조구로는 triton X-100 (1 mg/ml) 및 적혈구 용혈활성을 가진 amphotericin B (0.05 mg/ml)을 사용하였다. 용혈활성은 다음의 식을 이용하여 계산하였다[16].

$$(\%)\ \text{Hemolysis} = [(S - C)/(T - C)] \times 100.$$

S: 시료 첨가구의 흡광도, C: DMSO 첨가구의 흡광도, T: triton 첨가구의 흡광도.

기타 분석

Total flavonoid (TF) 및 Total polyphenol (TP) 함량 측정은 기존의 보고된 방법[30]에 따라 측정하였으며, 각각 rutin과 tannic acid를 표준시약으로 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid 법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다[34]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 23.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 $p < 0.05$로 하였다.

결과 및 고찰

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 성분 분석

함초 씨는 별도의 전처리 없이 열수 추출하였으며, 1차 추출 수율은 16.7%, 2차 추출 수율은 7.1%, 3차 추출 수율은 5.9%를 나타내어, 함초 씨 대비 최종 29.6%의 열수 추출물을 회수하였다. 이의 순차적 유기용매 분획 결과, hexane분획물은 0.1% 수율로 무시할 만 하였으며, EA 분획물은 3% 수율을 나타내었다. 이는 100 g의 함초 씨로부터 0.89 g의 EA 분획물을 회수할 수 있음을 의미한다. 이후의 butanol 분획물의 수율은 9.6%인 반면 물 잔류물은 열수 추출물의 87.3%를 차지하여 열수 추출물의 대부분이 수용성 물질임을 확인하였다. 함초 씨 열수 추출물의 TP 및 TF 함량 분석 결과, 각각 25.7 및 11.5 mg/g을 나타내어(Fig. 1A, 1B), 일반적인 성숙기 함초의 TP 및 TF 함량과 유사한 함량을 보였다[15]. 한편 분획물의 TP 함량 분석 결과, EA 분획에서 158.3 mg/g의 매우 높은 함량을 나타내었으며, butanol 분획 > hexane 분획 = 물 잔류물 순으로 나타났다(Fig. 1A). TF 분석 결과 역시 EA 분획에서 136.2 mg/g의 높은 함량을 나타내었으며, butanol 분획 > 물 잔류물 > hexane 분획 순으로 나타났다(Fig. 1B). 이러한 높은 TP 및 TF 함량은 복분자의 EA 분획의 39% 수준[14] 및 마가목 열매의 EA 분획의 60% 수준[17]을 나타내어, 함초 역시 복분자 및 마가목 열매처럼 다양한 유용생리활성을 나타낼 것으로 기대되었다. 총당 및 환원당 함량 분석 결과, 함초 씨의 열수 추출물은 각각 77.0 및 23.6 mg/g을 나타내어 함초 줄기보다 2배 높은 총당 함량을 나타내었다[15]. 특이하게도, 분획물 중 가장 높은 총당 및 환원당 함량은 물 잔류물이나 butanol 분획이 아닌 EA 분획에서 나타났으며(Fig. 1C, 1D), 이는 EA 분획이 glycosylated flavonoid 성분을 다량 함유한 것을 의미하고 있다. 현재 EA 분획의 chromatography 법에 의한 주요물질 분리 및 확인을 진행 중에 있다.

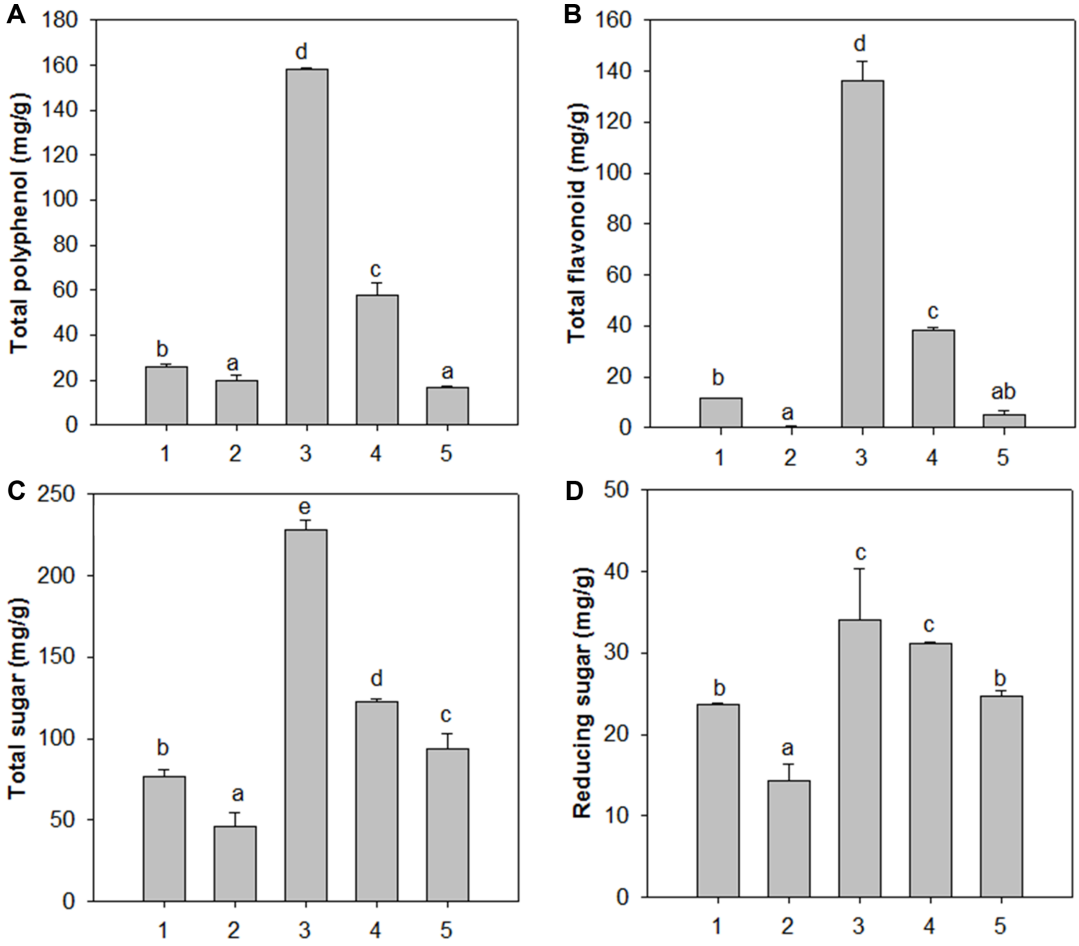

Fig. 1. Contents of total polyphenol (A), total flavonoid (B), total sugar (C) and reducing sugar (D) in the hot water extract (HWE) and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed. 1: HWE, 2: hexane fraction of HWE, 3: Ethylacetate fraction of HWE, 4: butanol fraction of HWE, and 5: Water residue of HWE. Different letters within a figure differ significantly ($p < 0.05$).

Table 1. Anti-microbial activities of the hot water extract and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed against pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi.

Samples /Chemicals	Growth inhibition zone (mm)									
	Gram positive bacteria				Gram negative bacteria				Fungi	
	SA[a]	SE	LM	BS	EC	PA	PV	ST	CA	SC
Ampicillin	18.0	32.0	20.0	20.0	-	-	30.0	9.0	-	-
Miconazole	-[b]	-	-	-	-	-	-	-	25.0	28.0
Hot water extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethylacetate fr[c]	13.0	10.5	12.0	10.5	-	-	8.0	-	-	-
Butanol fr	-	18.0	-	8.0	-	-	10.0	-	-	10.0
Water residue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a]SA: *Staphylococcus aureus*, SE: *Staphylococcus epidermidis,* LM: *Listeria monocytogenes*, BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, PV: *Proteus vulgaris*, ST: *Salmonella Typhimurium*, CA: *Candida albicans*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, [b]-: No inhibition, and [c]fr: fraction.

The concentrations of the seed samples and antibiotics used were 500 μg/disc and 1 μg/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a classical result of three independent determinations.

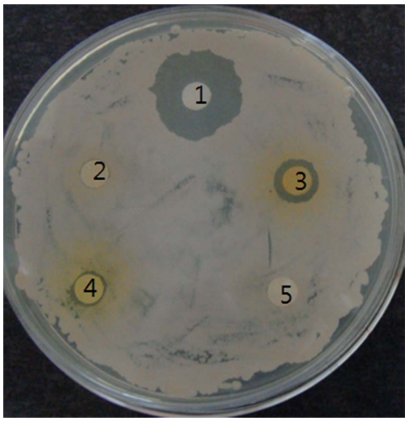

Fig. 2. Photography of antibacterial activity of the hot water extract (HWE) and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed. 1: ampicillin (1 μg/disc), 2: HWE, 3: ethylacetate fraction of HWE, 4: butanol fraction of HWE, and 5: Water residue of HWE.

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 항균활성

함초 씨 열수 추출물과 이들의 순차적 유기용매 분획물을 대상으로 항균 활성을 평가하였다. 먼저 대조구로 사용된 항세균제 ampicillin (1 μg/disc)은 *E. coli*와 *P. aeruginosa*를 제외한 모든 세균에 항균 활성을 나타내었으며, 항진균제인 miconazole (1 μg/disc)은 *C. albicans*와 *S. cerevisiae*에 대해 강력한 생육억제 활성을 나타내었다(Table 1). 함초 씨 열수 추출물과 이의 분획물 중 물 잔류물은 500 μg/disc 농도에서 전혀 항균 활성이 나타나지 않았으나, EA 분획과 butanol 분획은 다양한 세균에 대해 항균력을 나타내었다. 특히 EA 분획은 사용된 그람양성 세균 모두에 강한 생육억제를 나타내어, 신규의 항세균제로 개발 가능성이 높을 것으로 판단되었다. *B. subtilis*에 대한 ethylacetae 분획의 항균활성은 Fig. 2에 나타내었다. 이러한 결과는 함초 및 발효함초의 EA 분획 및 butanol 분획이 피부상재균 *S. epidermisdis* 및 *S. aureus*에 대해 항세균 활성을 나타낸다는 기존 보고

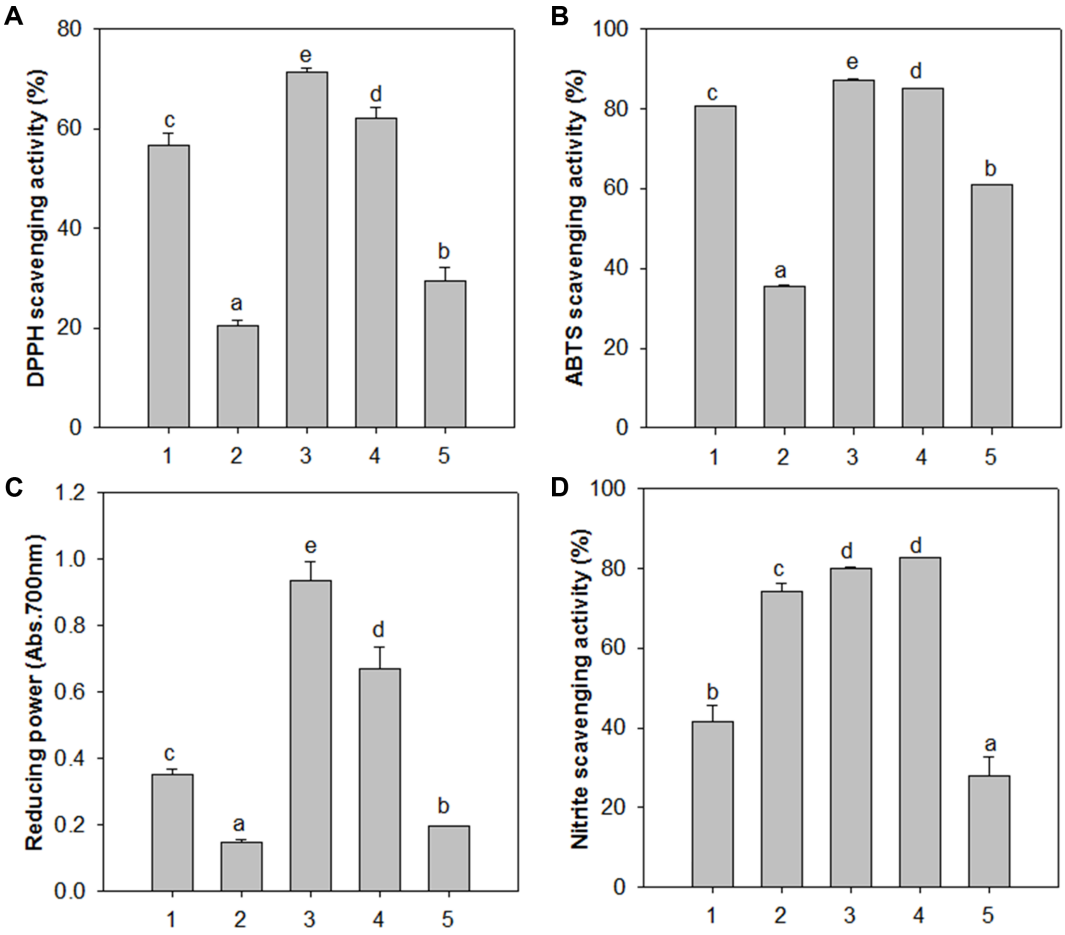

Fig. 3. Radical scavenging activities (A, B and C) and reducing power (D) of the hot water extract and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed. Different letters within a figure differ significantly ($p < 0.05$).

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1609.09002

[11, 25]와 일치하여, 함초 씨는 함초와 유사하게 항세균 물질을 함유하는 것으로 판단된다. 또한 butanol 분획물은 항진균 및 항세균 활성을 동시에 나타내어 항균 활성물질의 정제연구가 필요하다고 판단되며, EA 분획이 정제되지 않은 상태에서도 광범위한 그람양성균에 대한 항균 활성을 나타냄을 고려한다면, EA 분획의 정제된 활성물질은 매우 강력한 항균 활성을 나타내리라 예상된다.

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성

함초 씨 열수 추출물 및 이의 분획물을 500 μg/ml 농도로 조정하여 DSA, ASA 및 환원력을 측정한 결과, 열수 추출물은 각각 56.6%, 80.7%의 소거능과 0.352의 환원력을 나타내어(Fig. 3A–C), 함초 줄기와 비교시 DSA는 약 20% 정도 약하나, ASA 및 환원력은 거의 동일하였다[15]. 분획물 중에서는 EA 분획물이 열수 추출물보다 15 및 7% 높은 DSA 및 ASA를 나타내었으며, 환원력은 약 3배 증가되었다(Fig. 3C). 한편 함초 씨 열수 추출물 및 이의 분획물을 200 μg/ml 농도로 조정하여 NSA를 측정한 결과, hexane 분획, EA 분획, butanol 분획 모두에서 74.1–82.6%의 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3D). 따라서 함초 씨의 분획물 중, EA 분획에서 다양한 활성 radical에 대한 강력한 소거 활성과 환원력이 확인되었다.

함초 씨 시료의 다양한 농도에서 항산화 활성을 측정한 값을 바탕으로 RC_{50}을 계산하였다. 그 결과, EA 분획의 DSA, ASA 및 NSA에 대한 RC_{50}은 다른 분획물보다 유의적으로 매우 낮게 나타났으며, 각각 57.0, 24.2 및 28.9 μg/ml로 계산되었다(Table 2). 항산화력이 우수하다고 알려진 복분자 EA 분획의 DSA, ASA 및 NSA에 대한 RC_{50}이 각각 24.6, 12.4 및 24.5 μg/ml임[14]을 고려한다면 함초 씨 EA 분획 역시 매우 강력한 항산화 활성 물질을 포함하고 있음을 알 수 있다. 한편 vitamin C의 DSA, ASA 및 NSA에 대한 RC_{50}은 10.0, 3.9 및 17.0 μg/ml로 나타나, EA 분획은 vitamin C에 비해 각각 5.7배, 6.2배 및 1.7배의 농도에서 동일한 DSA, ASA, 및 NSA를 나타내었다. 함초 씨의 EA 분획이 100℃에서 3시간 이상 가열 추출하여 제조된 것을 고려하면, vitamin C보다 월등한 열 안전성을 나타내어, 신규의 항산화제로 개

Table 2. The calculated RC_{50} (the concentration required to scavenger 50% of particular radical under the standard conditions) of the hot water extract and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed.

Samples/Chemical	RC_{50} (μg/ml)		
	DPPH	ABTS	Nitrite
Hot water extract	449.9 ± 23.2[d]	189.0 ± 3.2[d]	250.0 ± 25.1[e]
Hexene fr[1)]	1210.4 ± 36.0[f]	574.3 ± 114.1[f]	111.2 ± 12.4[d]
Ethylacetate fr	57.0 ± 4.6[b]	24.2 ± 4.3[b]	28.9 ± 1.8[b]
Butanol fr	205.1 ± 3.1[c]	75.4 ± 2.3[c]	55.3 ± 1.6[c]
Water residue	805.2 ± 62.1[e]	342.9 ± 32.6[e]	324.3 ± 46.5[f]
Vitamin C	10.0 ± 0.7[a]	3.9 ± 0.4[a]	17.0 ± 2.3[a]

[1]fr: fraction. Different letters within a column differ significantly ($p < 0.05$).

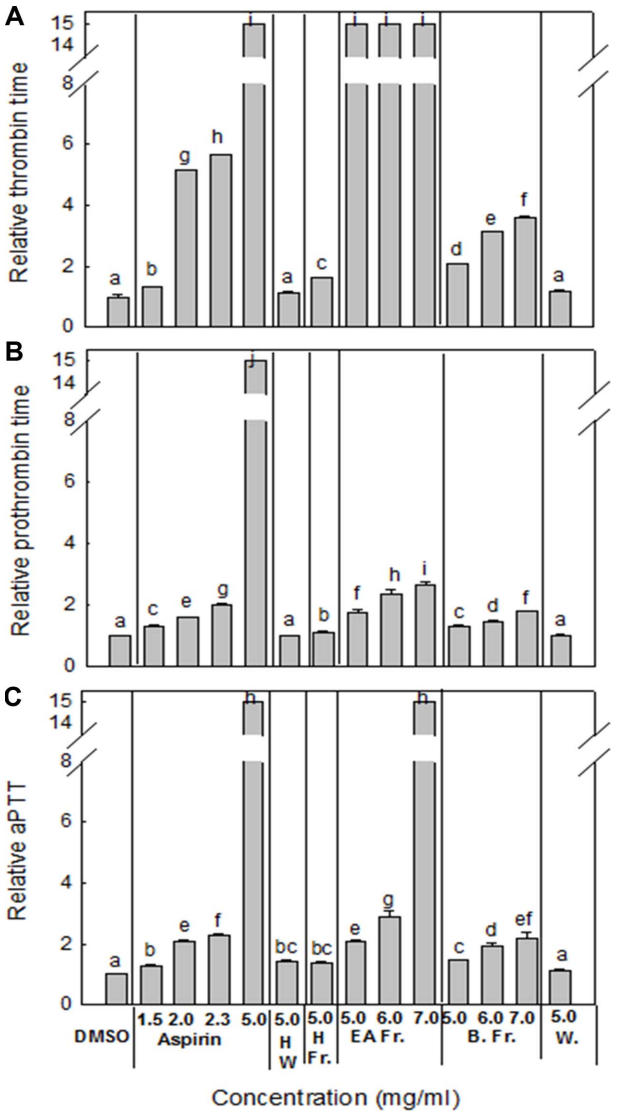

Fig. 4. Effect of the hot water extract and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed on blood coagulation. HW: hot water extract, H Fr.: hexane faction of HWE, EA Fr.: Ethylacetate fraction of HWE, B Fr.: butanol fraction of HWE, and W: Water residue of hot water extract prepared from *Salicornia europaea* seed. Data are presented as relative clotting time of sample based on solvent control. The thrombin time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time of solvent control (dimethylsulfoxide) were 26.2 sec, 18.7 sec and 46.5 sec, respectively. Aspirin was used as a positive control. Different letters within a figure differ significantly ($p < 0.05$).

발 가능성이 높다고 판단된다. 또한 심혈관계 질환과 관련된 혈전 생성에 산화적 스트레스가 직접 관련되어 있으며[1], 산화적 스트레스에 의한 혈관내 fibrinogen의 구조적 변화가 혈전 생성을 촉진하여 혈류 흐름을 저해함[24]을 고려한다면, 함초 씨의 EA 분획은 항혈전 활성에도 관련될 것으로 예측되었다.

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 항응고 활성

함초 씨 열수 추출물 및 이의 분획물의 항혈전 활성평가를 위해, 먼저 혈액응고 저해 활성을 TT, PT, aPTT를 측정하여 평가하였다. 임상에서 항혈전제로 사용되고 있는 aspirin (1.5 mg/ml)은 무처리구에 비해 TT는 1.32배(Fig. 3A), PT는 1.29배(Fig. 4B), aPTT는 1.29배(Fig. 4C) 연장시켜 대조구와는 유의적으로 다른 우수한 혈액응고저해 활성을 나타내었으며, 이러한 aspirin의 항혈전 활성은 농도 의존적으로 증가되어 5 mg/ml 농도에서는 TT, PT, aPTT 모두를 무처리구에 비해 15배 이상 연장시켰다. 한편 함초 씨 열수 추출물의 경우 5 mg/ml 농도에서 1.4배의 aPTT 연장을 나타내었으나, TT 및 PT 연장효과는 미미하였다. 이러한 현상은 함초 열수 추출물의 항응고 활성과 거의 유사하였다[15]. 분획물 중에서는 EA 분획에서 TT와 aPTT 연장효과가 월등하였으며(Fig. 4A, 4C), PT의 경우에도 농도 의존적인 증가를 나타내었다(Fig. 4B). 특히 EA 분획은 5 mg/ml 농도에서 TT를 무첨가구에 비해 15배 이상 연장시켰으며, 7 mg/ml 농도에서 aPTT를 무첨가구에 비해 15배 이상 연장시켜 아스피린에 필적하는 강력한 항응고 활성을 나타내었다(Fig. 4A). 함초 씨의 butanol 분획 역시 농도 의존적인 우수한 항응고 활성을 나타내었으며, 5 mg/ml 농도에서 무처리구에 비해 TT는 2.08배, PT는 1.32배, aPTT는 1.48배 연장시켜 아스피린 1.5 mg/ml 농도에서의 혈액응고저해 활성보다 우수하였다. 이러한 결과는 함초 씨의 활성분획물이 위장 장애 등의 부작용이 많은 aspirin을 대치, 보완할 수 있는 신규의 항혈전제로 개발 가능함을 나타내고 있다.

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 혈소판 응집저해 활성

함초 씨 열수 추출물 및 이의 분획물의 항혈전 활성평가의 일환으로 인간 혈소판에 대한 응집저해 활성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 먼저 용매 대조구로 사용된 DMSO의 경우amplitude 20Ω, area under 145.1을 나타내었으며, 상업적으로 이용되고 있는 혈소판 응집저해제인 aspirin (0.25 mg/ml)은 amplitude 11Ω, area under 66.0를 나타내어 DMSO에 비해 45.9%의 혈소판 응집을 나타내었다. 또한 aspirin은 농도 농도의존적인 혈소판 응집저해를 나타내었다. 한편 함초 씨 열수 추출물(0.25 mg/ml)은 혈소판 응집을 저해하지 않았으며, 이는 기존의 보고된 함초 잎, 줄기 추출물의 혈소판 응집도와 유사하였다[15]. 함초 씨 추출물의 분획물 역시 혈소판 응집저해를 나타내지 않았다. 특히 강력한 항균, 항산화, 항응고 활성을 나타낸 EA 분획은 amplitude 28Ω, area under 275.3을 나타내어 혈소판 응집을 촉진하는 것으로 확인되었다. 그러나 실제적인 항혈전제로 사용되기 위해서는 혈소판 응집저해 활성과 혈액응고 저해활성이 동시에 나타나는 것이 바람직하다. 따라서, 함초 씨의 항혈전제로서의 실제적 이용을 위해서는 EA 분획을 대상으로 혈소판 응집촉진 활성물질과 혈액응고 저해 활성물질을 각각 분리하는 것이 필요하며, 현재 순수물질의 분리가 진행 중에 있다.

Table 3. Platelet aggregation activities of the hot water extract and its solvent fractions of the *Salicornia europaea* seed.

Sample/ Chemicals	Conc. (mg/ml)	Amplitude (ohm)	Slope	Lag time (sec)	Area under	PAR[a] (%)
DMSO	-	19	4	30	142.5	99.1
	-	20	3	26	145.1	100.9
Aspirin	0.50	7	1	102	35.4	24.6
	0.25	11	1	46	66.0	45.9
	0.125	15	2	32	98.8	68.7
Hot water ex[b].	0.25	25	4	26	186.4	129.6
Hexane fr[c].	0.25	20	6	2	182.8	127.1
Ethylacetate fr.	0.25	28	8	4	275.3	191.4
Butanol fr.	0.25	28	6	19	235.4	163.7
Water residue	0.25	28	6	16	246.8	171.6

[a]PAR: Platelet Aggregation Ratio, [b]ex: extract, [c]fr: fraction. Data are presented as a representative result relative of independent three determinations. Amplitude is expressed as ohms by maximum extent of platelet aggregation, and slope (rate of reaction) is determined by drawing a tangent through the steepest part of curve. Area under is a calculated area in descent drawing during platelet aggregation. Aspirin was used as a positive control.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1609.09002

함초 씨 추출물 및 이의 분획물의 인간 적혈구 용혈활성

함초 씨 열수 추출물 및 이의 분획물의 세포 독성 평가 및 항혈전제로의 적용성을 검토하기 위해 1 mg/ml 농도에서 인간 적혈구의 용혈활성을 평가하였으며, 그 결과 모든 함초 씨 시료에서 적혈구 용혈현상은 전혀 나타나지 않았다 (results not shown). 반면, 대조구로 사용된 triton X-100 (1 mg/ml) 및 amphotericin B (0.05 mg/ml)는 각각 98% 이상의 용혈현상을 나타내었다. 따라서 함초 씨 추출물과 이의 분획물은 별도의 급성독성을 나타내지 않으리라 판단된다. 상기의 연구결과는 별도의 용도가 없는 함초 씨를 이용한 식의약품 소재 개발이 가능하며, 특히 함초 씨 추출물의 EA 분획이 항세균 및 항혈전제로 개발될 수 있음을 제시하고 있다.

요 약

함초를 이용한 고부가가치 식의약 소재 개발 연구의 일환으로, 성숙 함초로부터 씨를 회수하고 이의 성분분석 및 유용 생리활성을 평가하였다. 함초 씨의 열수 추출효율은 29.6% 이었으며, 추출물의 total polyphenol (TP) 및 total flavonoid (TF) 함량은 각각 25.7 및 11.5 mg/g을 나타내어 성숙기 함초와 유사한 함량을 보였다. Hexane, ethylacetate (EA), butanol을 이용한 순차적 유기용매 분획물 중 EA 분획이 158.3 및 136.2 mg/g의 가장 높은 TP 및 TF 함량을 보였으며, 특이하게 물 잔류물 및 butanol 분획물보다 높은 총당 함량(228.3 mg/g)을 나타내었다. 함초 씨 시료의 항균 활성 평가 결과, EA 분획에서 그람양성 세균에 대한 광범위한 항세균 활성이 나타났으며, butanol 분획에서도 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 강력한 항균활성을 확인하였다. 한편, 함초 씨 열수 추출물은 우수한 radical 소거능과 환원력을 나타내었으며, 가장 강력한 항산화 활성은 EA 분획에서 나타났다. EA 분획의 DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 Nitrite 소거능에 대한 RC_{50}은 각각 57.0, 29.0 및 28.9 μg/ml로 확인되어, vitamin C의 10.7, 4.0 및 18.0 μg/ml보다 약하지만 우수한 항산화능을 확인하였다. 항혈전 활성 평가결과, EA 분획은 5 mg/ml 농도에서 thrombin time을 무첨가구에 비해 15배 이상, 7 mg/ml 농도에서 activated partial thromboplastin time을 15배 이상 연장시켜 아스피린에 필적하는 강력한 항응고 활성을 나타내었다. 반면 함초 씨 추출물과 분획물(0.25 mg/ml)은 모두 혈소판 응집저해 활성은 나타나지 않았으며, 1 mg/ml 농도까지 인간 적혈구 용혈활성도 나타나지 않았다. 상기의 연구결과는 함초 씨 추출물의 EA 분획의 활성물질을 정제하여 항세균 및 항혈전제 개발이 가능함을 제시하고 있다.

Acknowledgments

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program (No. 115008-2), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

References

1. Bijak M, Nowak P, Bobrowiecka M, Ponczek M, Zbikowska H, Wacowicz B. 2012. Protective effects of (-)-epicatechin against nitrative modifications of fibrinogen. *Thrombosis Res.* **130**: 123-128.
2. Cha JY, Jeong JJ, Kim YT, Seo WS, Yang HJ. Kim JS, *et al.* 2006. Detection of chemical characteristics in hamcho (*Salicornia herbacea* L) according to harvest periods. *J. Life Sci.* **16**: 683-690.
3. Cho HD, Lee JH, Jeong JH, Kim JY, Yee ST, Park SK, *et al.* 2014. Production of novel vinegar having antioxidant and anti-fatigue activities from *Salicornia herbacea* L. *J. Sci. Food Agric.* **96**: 1085-1092.
4. Cho JY, Park SY, Shin MJ, Gao TC, Moon JH, Ham KS. 2010. Isolation and identification of antioxidative compounds in fermented glasswort (*Salicornia herbacea* L.) juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1137-1142.
5. Cho YS, Kim SI, Han YS. 2008. Effects of slander glasswort (*Salicornia herbacea* L.) extract on improvements in bowel function and constipation relief. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**: 326-331.
6. Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH, *et al.* 2005. Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from *Salicornia herbacea*. *Arch Pharm. Res.* **28**: 1122-1126.
7. Han EH, Kim JY, Kim HG, Chun HK, Chung YC, Jeong HG. 2010. Inhibitory effect of 3-caffeoyl-4-dicaffeoylquinic acid from *Salicornia herbacea* against phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Chem. Biol. Interact.* **183**: 397-404.
8. Jang HS, Kim KR, Choi SW, Woo MH, Choi JH. 2007 Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts. *Ann. Nutr. Metab.* **51**: 119-125.
9. Jo YC, Ahn JH, Chon SM, Lee KS, Bae TJ, Kang DS. 2002. Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean J. Med. Crop Sci.* **10**: 93-99.
10. Karadeniz F, Kim JA, Ahn BN, Kwon MS, Kong CS. 2014. Effect of *Salicornia herbacea* on osteoblastogenesis and adipogenesis in vitro. *Mar. Drugs* **12**: 5132-5147.
11. Kim HJ. 2013. Antioxidant and antibacterial activities from extracts of *Salicornia herbacea* L. and *Erythronium japonicum*. Sunchon University MS thesis.
12. Kim HS, Yoon SY, Cho JW. 2008. Quantitative analysis of flavonoids from *Salicornia herbacea* L. extract by LC-MS. *Korean J. Med. Crop Sci.* **16**: 231-237.
13. Kim MJ, Jun HY, Kim JH. 2015. Anti-obesity effect of Korean hamcho (*Salicornia herbacea* L.) powder on high-fat diet-induced obese rats. *J. Nutr. Health* **48**: 123-132.

14. Kim MS, Kang DK, Shin WC, Sohn HY. 2015. Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-thrombosis activities of the lees of bokbunja wine. *J. Life Sci.* **25**: 757-764.
15. Kim MS, Seong HJ, Kim DH, Sohn HY. 2016. Changes of in-vitro anti-oxidant and anti-thrombosis activities of *Salicornia europaea* according to harvest time. *J. Life Sci.* **26**: In press.
16. Kim MS, Shin WC, Kang DK, Sohn HY. 2016. Anti-thrombosis activity of sinapic acid isolated from the lees of bokbunja wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 61-65.
17. Kim MS, Sohn HY. 2016. Anti-coagulation and anti-platelet aggregation activity of the mature fruit of *Sorbus commixta*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 373-377.
18. Kim YA, Kong CS, Lee JI, Kim H, Park HY, Lee HS, *et al.* 2012. Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea*. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **22**: 4318-4322.
19. Lee CH, Kim IH, Kim YE, Oh SW, Lee HJ. 2004. Determination of betaine from *Salicornia herbacea* L. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 1584-1587.
20. Lee JN, Kim MS, Kim DH, Sohn HY. 2016. Anti-oxidation and anti-thrombosis activities of different parts of *Salicornia herbacea* L. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 311-316.
21. Lee YS, Lee HS, Shin KH, Kim BK, Lee BK. 2004. Constituents of the halophyte *Salicornia herbacea*. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 1034-1036.
22. Lim MR, Kang SM. 2009. Improvement effect of *Salicornia herbacea* L. diet on the acne skin. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **19**: 750-760.
23. Lim GS, Kim R, Jeon KM, Choi HS, Koh HY, Cho H, *et al.* 2013. Chemical properties and nitrite scavenging and acetylcholinesterase inhibitory activities from *Salicornia herbaciea* seed. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **28**: 372-379.
24. Martinez M, Weisel JW, Ischiropoulos H. 2013. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radical Biol. Med.* **65**: 411-418.
25. Mo JH. 2011. Screening of biologically active substances and acne skin improvement effect of the extracts from fermented *Salicornia herbacea*. Kwangju women's University, Kwangju, Korea.
26. Pichiah PT, Cha YS. 2014. *Salicornia herbacea* prevents weight gain and hepatic lipid accumulation in obese ICR mice fed a high-fat diet. *J. Sci. Food Agric.* **95**: 3150-3159.
27. Ryu DS, Kim SH, Lee DS. 2008. Immuno-modulating activity of *Salicornia herbacea* extract. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. **36**: 135-141.
28. Ryu DS, Kim SH, Lee DS. 2009. Anti-proliferative effect of polysaccharides from *Salicornia herbacea* on induction of G2/M arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol*. **19**: 1482-1489.
29. Shin KS, Boo HO, Jeon MJ, Ko JY. 2002. Chemical components of native plant, *Salicornia herbacea* L. *Korean J. Plant Res*. **15**: 216-220.
30. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocaleau reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178.
31. Song TC, Lee CH, Kim YE, Kim IH, Han DS, Yang DH. 2007. The functionality of the saltwort (*Salicornia herbacea* L.) extract fermented juice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 395-399.
32. Song HS, Kim DP, Jung YH, Lee MK. 2007. Antioxidant activities of red hamcho (*Salicornia herbacea* L.) against lipid peroxidation and the formation of radicals. *Korean J. Food Nutr.* **20**: 150-157.
33. Sweeney JD, Hoerning LA, Behrens AN, Novak E, Swank RT. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of in-vitro hypersensitivity to ristocetin. *Am. J. Clin. Path.* **93**: 522-525.
34. Valentina U, Fabcic J, Stampar F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem*. **107**: 185-192.
35. Wang X, Zhang M, Zhao Y, Wang H, Liu T, Xin Z. 2013. Pentadecyl ferulate, a potent antioxidant and antiproliferative agent from the halophyte *Salicornia herbacea*. *Food Chem*. **141**: 2066-2074.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1609.09002