

추출용매에 따른 톳(*Hizikia fusiformis*) 추출물의 항산화 및 생리활성 비교

이연지 · 전유진¹ · 김용태*

군산대학교 식품생명공학전공, ¹제주대학교 수산생명의학전공

Comparison of Antioxidant and Physiological Activities of Various Solvent Extracts from *Hizikia fusiformis*

Yeon-Ji Lee, You-Jin Jeon¹ and Yong-Tae Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

¹Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

The seaweed *Hizikia fusiformis* is rich in protein, carbohydrates, vitamins, and minerals. This study investigated the antioxidant and physiological activities of *H. fusiformis* extracts prepared with 70% ethanol, 80% methanol, or distilled water. The extraction yields of these various solvent extracts were as follows: ethanol extract, 15.26%; methanol extract, 17.95%; and water extract, 45.62%. The methanol extract showed the highest total polyphenol content (24.06 mg GAE/g), but total flavonoid content was similar in all extracts. ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging activity was highest in the ethanol extract (IC₅₀: 0.90 mg/mL), while the methanol extract exhibited the strongest DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity (IC₅₀: 8.09 mg/mL), reducing power (EC₅₀: 0.40 mg/mL), and ferric reducing antioxidant power (0.28 mM). By contrast, tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities were higher in the ethanol extract than in the other extracts. The high BACE1 (β -secretase) inhibitory activity was observed in the ethanol extract (IC₅₀: 1.03 mg/mL). These results indicate that *H. fusiformis* ethanol extracts may be useful for their antioxidant and functional properties in food and pharmaceutical materials.

Keywords: Antioxidative activity, Anti-dementia, BACE1, *Hizikia fusiformis*, Physiological activity

서론

현대의 도시화와 공업화로 인한 환경오염과 서구화된 식생활 변화로 인하여 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 뇌혈관 및 심혈관계 질환 등의 대사질환 발병률 및 사망률이 증가하는 추세에 있다. 특히 노령층 인구의 증가로 성인병을 비롯한 노화 및 암 등을 예방하기 위해 건강 지향적인 제품을 구입하는 소비자들이 큰 폭으로 증가하고 있다. 이에 따라, 건강 증진을 위한 다양한 건강 기능성식품 및 의약품 소재에 대한 관심이 높아지면서 천연물, 농·수산물 및 해양생물로부터 생리기능성을 가진 생리활성물질에 대한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다(Cho and Choi, 2010; Lee et al., 2016; 2020a). 이러한 생리활성물질에 관한 연구의 대부분은 육상생물로부터 많이 이루어져 왔는데 그 연

구대상의 한계와 환경 오염 등으로 인하여 최근 해양생물이 육상생물의 대체자원으로 주목받고 있다(Byun and Kim, 2005; Lee, 2011). 해양생물은 육상생물에 비하여 특유의 대사과정과 독특한 생육 환경으로 인하여 다양한 생리활성물질을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 최근엔 해양 동물, 해조류, 해양 미생물 등 다양한 해양생물 유래 기능성 및 생리활성 물질에 대한 연구가 진행되어 왔으며, 생리활성 물질에 관한 연구 결과를 토대로 건강 기능성 식품 및 의약품 소재로 개발되고 있다(Kwon and Youn, 2017). 해양생물 중에서도 해조류는 다양한 기능성 물질을 함유하고 있는 것으로 확인되어 식품, 화장품 및 의약품 소재 개발을 위한 유용한 자원 중 하나로 평가되고 있다(Lee et al., 2017). 톳(*Hizikia fusiformis*)은 갈조류 모자반과에 속하며 형태는 원주상 줄기로 체장 20-100 cm까지 성장하는 다년생

*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1824 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: kimyt@kunsan.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0886>

Korean J Fish Aquat Sci 53(6), 886-893, December 2020

Received 15 October 2020; Revised 10 November 2020; Accepted 25 November 2020

저자 직위: 이연지(대학원생), 전유진(교수), 김용태(교수)

해조류이다. 주로 아시아 해안에서 많이 분포하고 있으며, 한국에서는 서·남해안 및 제주도에서 많이 서식하고 있다. 한국에서의 톳 생산량은 2010년 21,133톤; 2019년 33,477톤으로 지역적, 계절적 영향 없이 안정적인 공급과 표준화된 생산기술을 통해 연간 약 2-4만톤 정도 생산하고 있으며, 건강식품, 의약품 및 화장품 등 다양한 분야에서 많은 연구가 진행되고 있는 해조류이다(Lee et al., 2020a; Statistics Korea, 2020). 일반적으로 톳은 무기질과 다당류로 구성되어 있으며, 특히, 천연 정미성분인 아미노산(glutamic acid 및 aspartic acid)과 식이섬유 및 칼슘, 철, 요오드 같은 무기질, 비타민 등이 풍부한 식품으로 알려져 있다(Lee et al., 2016). 더구나, 톳은 항산화 효과(Siriwardhana et al., 2003; Kim et al., 2013), 항균성 효과(Kim et al., 1994), 항염증 효과(Kwon et al., 2015) 및 인간 피부 섬유아세포 보호 효과(Cui et al., 2019) 등의 기능성 효과가 있다고 보고되어 있으나, 감태, 다시마, 미역 등에 비해 연구의 다양성이 부족할 뿐만 아니라 생리활성물질 탐색 및 각종 질병 관련 연구도 다소 미비한 실정이다(Cui et al., 2019). 따라서 본 연구에서는 해조 다당류가 풍부하고 면역력 증강 및 생리활성 효과가 우수한 기능성 소재인 톳의 생리 기능성 물질을 대량 획득하기 위하여 톳을 증류수, 에탄올 및 메탄올을 용매로 사용하여 톳 추출물의 유용성분의 획득 증대 및 다양한 생리활성의 분석을 통해 추출용매의 효과를 규명하여 톳 추출물의 항산화 및 생리기능성 소재 개발의 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 실험에 사용된 톳(*Hizikia fusiformis*)은 완도산으로 건조된 것을 군산공설시장에서 구입하여, 분쇄하여 분말형태로 만들어 추출물 제조에 사용하였다. 항산화활성 및 생리활성을 측정하기 위하여 Folin-Ciocalteu's reagent, gallic acid, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, vitamin C, mushroom tyrosinase, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), kojic acid, angiotensin I-converting enzyme (ACE), hippuryl-his-leu (HHL) acetate salt, captopril, acetylcholinesterase (AChE), acetylthiocholine iodide (ATC), 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 등은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. yeast α -glucosidase, p -nitrophenol- α -glucopyranoside는 Wako Chemical Co. (Kanagawa, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

톳 추출물의 제조

건조된 톳을 분쇄기(FM700SS, Hanil, Seoul, Korea)로 곱게

분쇄한 후 3가지 용매(증류수, 70% ethanol, 80% methanol)를 사용하여 각각의 톳 추출물을 제조하였다. 증류수를 용매로 사용한 추출은 톳 50 g과 증류수 200 mL를 비닐 팩에 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출장치(ISA-CIP-S30-200, Ilshin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 300 MPa의 압력으로 3시간 동안 실행하였다. 초고압 공정이 끝난 시료를 추출 flask에 넣고 증류수 300 mL를 더 첨가하여 100°C에서 3시간 더 추출하였다. 유기 용매를 사용한 추출은 70% ethanol과 80% methanol을 추출 용매로 각각 사용하여 시료 50 g에 각 추출용매를 시료 대비 20배의 양으로 첨가하여 25°C에서 24시간 동안 shaking incubator (120 rpm)에서 추출하였다. 각 용매별로 추출한 톳 추출물들을 여과한 후 여액을 회수하였다. 얻어진 각각의 추출물들을 감압 농축하고, 동결건조한 후에 -20°C 냉동고에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

색도 측정

각 추출물의 색도는 색차계(JC801, Color Techno System Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 L (명도), a (적색도) 및 b (황색도)값을 측정하였다. 시료 당 3회 반복하여 측정된 뒤 그 평균값을 나타내었다. 측정 시 사용한 표준 백색판(calibration plate)은 L값이 96.5, a값은 -0.13, b값은 -0.05이었다.

Total polyphenol 및 Total flavonoid 함량 측정

톳 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis 법을 약간 변형한 Shetty et al. (1995)의 방법에 준하여 수행하였다. 각 시료(1 mL)에 95% 에탄올 용액 1 mL와 증류수 5 mL를 넣어 혼합한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣고 실온에서 5분간 반응시켰다. 여기에 5% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가한 후 실온·암소에서 1시간 동안 반응시킨 후 분광광도계(Optizen Pop, KLAB, Seoul, Korea)를 이용하여 파장 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 동일한 방법으로 작성된 표준 총 폴리페놀 함량으로 환산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Moreno et al. (2000)의 방법을 약간 변형하여 아래와 같이 측정하였다. 각 시료 용액(0.5 mL)에 1.5 mL, 95% 에탄올을 혼합한 다음 0.1 mL, 10% aluminum nitrate와 0.1 mL, 1 M potassium acetate를 차례로 가하여 혼합한 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 증류수 2.8 mL를 가하여 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 파장 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 동일한 방법으로 작성된 표준 곡선으로부터 총 플라보노이드 함량으로 환산하였다.

ABTS 라디칼 소거활성 측정

ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA]

radical 소거능은 ABTS⁺ radical decolorization assay (Re et al., 1999) 방법을 이용하여 측정하였다. 7.4 mM의 ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 동량 혼합하여 실온·암소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 734 nm에서 흡광도가 1.000±0.030 (mean±SD)가 되도록 phosphate-buffered saline (pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 추출물 50 µL에 ABTS 용액 950 µL를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 계산식, ABTS⁺ radical scavenging ability(%)=[(Control₇₃₄-Sample₇₃₄)/Control₇₃₄]×100에 의하여 활성을 산출하였다. IC₅₀ value (mg/mL)는 50%의 ABTS⁺ radical 소거활성을 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다.

DPPH 라디칼 소거활성 측정

시료의 산화방지 활성을 측정하기 위하여 자유라디칼인 DPPH를 사용한 라디칼 소거활성의 측정은 Blois (1958)의 방법을 다소 수정한 Lee et al. (2017)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료액(1.5 mL)에 동량의 0.4 mM DPPH radical ethanolic solution (1.5 mL)과 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 파장 516 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 아래의 계산식, DPPH radical scavenging ability(%)=[(Control₅₁₇-Sample₅₁₇)/Control₅₁₇]×100에 의하여 활성을 산출하였으며, IC₅₀ value (mg/mL)는 50%의 DPPH 소거활성을 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다. 이때, 대조구는(Control₅₁₇)는 시료용액 대신 탈 이온수를 가하여 측정된 흡광도를 나타내었다.

환원력 측정

환원력(reducing power)은 Oyaizu et al. (1988)의 방법을 일부 수정한 Lee et al. (2020b)의 방법으로 측정하였다. 각 시료용액(1 mL)에 1 mL의 0.2 M sodium phosphate 완충액(pH 6.6)과 1 mL의 1% (w/v) potassium ferricyanide을 차례로 가하여 혼합한 후, 50°C의 항온수조에서 20분 동안 반응시켰다. 이 반응액에 1 mL의 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 가하여 반응을 정지시킨 후, 원심분리(1,890 g, 10분)하였다. 상층액 1.5 mL에 1.5 mL의 증류수와 0.3 mL의 0.1% (w/v) ferric chloride 용액을 혼합하여, 10분 동안 실온에서 정치한 후, 파장 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력으로 나타내었으며, 흡광도가 높을수록 환원력이 큰 것을 의미한다. EC₅₀ value는 흡광도 값이 0.5를 나타내는 시료의 농도(mg/mL)로 정의하였다.

FRAP value 측정

FRAP (Ferric reducing antioxidant power)에 의한 환원력 측정은 Benzie and Strain (1996)의 방법을 사용하여 측정하였다. 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하

였다. 이어서 여러 가지 농도의 시료액 0.15 mL와 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FeSO₄·7H₂O를 표준물질로 사용하여 동일한 방법으로 얻은 표준 검량선으로부터 FRAP value (mM)를 계산하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

각 시료용액의 tyrosinase 저해활성은 Iida et al. (1995)의 방법을 다소 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 300 µL의 시료용액은 900 µL의 mushroom tyrosinase (50 Unit/mL)와 1.5 mL의 50 mM Phosphate buffer (pH6.8)을 혼합하여 실온에서 30분 동안 전단계 반응을 실시한 후, 300 µL의 10 mM 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) 용액을 가하여, 파장 475 nm에서 20분 동안 1분 간격으로 생성되는 dopachrome의 흡광도를 모니터링하면서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성(%)은 다음 식, Tyrosinase inhibitory activity (%)=[(Control₄₇₅-Sample₄₇₅)/Control₄₇₅]×100을 통하여 계산하였다. 여기서 대조구(Control₄₇₅)는 시료 대신 탈 이온수를 가하여 측정된 흡광도를 의미하였다.

α-Glucosidase 저해활성 측정

각 시료의 α-glucosidase 저해활성은 Watanabe et al. (1997)의 chromogenic assay법에 따라 p-nitrophenol glucoside를 이용하여 측정하였다. Yeast α-glucosidase를 반응용액(100 mM phosphate buffer, pH 7.0, 0.2% bovine serum albumin 및 0.02% NaN₃)에 녹여 0.7 U/mL로 제조하여 효소용액으로 사용하였고, 기질용액은 p-nitrophenyl-α-glucopyranoside (5 mM)을 동일한 반응용액에 녹여서 제조하였다. 반응은 효소용액 100 µL와 시료용액 20 µL를 well에 넣고 혼합하여 405 nm에서 흡광도(time zero)를 측정하였다. 실온에서 5분간 incubation한 다음, 기질용액 100 µL를 첨가하여 실온에서 5분간 incubation한 후 흡광도를 측정하여 증가된 흡광도 변화를 계산하였다. 이때 실험의 대조군으로는 α-glucosidase 저해제로 알려진 acarbose를 사용하였다. 효소활성의 저해정도는 다음 식, α-Glucosidase inhibitory activity (%)=[1-(Sample₄₀₅/Control₄₀₅)]×100에 따라 산출하였으며, control은 시료 무첨가구의 흡광도 변화 값을 나타내었다.

BACE1 (β-Secretase) 저해활성 측정

각 시료의 BACE1 (β-Secretase) 효소활성은 Lee (2017)의 방법에 따라 측정하였다. 본 실험에 사용한 BACE1 효소는 Lee (2017)의 방법에 따라 정제한 효소를 사용하였고, 기질(MO-CAC-SEVNLDAEFRK(Dnp)RR)은 Peptron Co. (Daejeon, Korea)에서 합성 및 정제하여 사용하였다. 일반적인 저해활성은 black 96-microwell plate에 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 225 µL, BACE1 10 µL 및 각 시료 10 µL를 순서대로 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 preincubation을 한

다음, 0.5 mM substrate 5 µL를 첨가하여 37°C에서 15분간 효소 반응을 측정하였다. 효소 반응은 기질 첨가로 시작되고, 효소활성은 microplate reader (Infinte F200, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 Ex 328/Em 393 nm에서 연속적으로 형광강도를 측정하여 초기반응속도를 분석하였다. 대조구로는 시료 대신 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0) 10 µL를 가하여 측정하였으며, 저해활성의 계산은 다음 식, BACE1 inhibitory activity(%)=[100-(SV/CV)]×100과 같이 산출하였다. SV, 시료 존재하의 초기반응속도; CV, 대조구의 초기반응속도.

통계처리

실험 결과는 SPSS 22.0 package program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)으로 통계처리 하여 3회 측정된 값의 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 간의 유의성 검증은 분산분석 (ANOVA)을 한 후 P<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 따라 분석하여 시료 간 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

톳 추출물의 수율 및 색도 분석

톳에 함유되어 있는 생리기능성 물질의 대량 획득 및 미량의 유용성분을 추출하기 위하여 70% EtOH, 80% MeOH 및 증류수를 추출 용매로 사용하여 각각 톳 추출물을 제조하였다. EtOH 및 MeOH를 추출 용매로 사용할 때에는 실온에서 24시간 동안 shaking incubator에서 톳 추출물을 제조하였으나, 증류수로 추출할 경우에는 추출물의 수율을 증대시키기 위하여 초고압 추출조건에서 톳 추출물을 제조하였다. 각각의 톳 추출물의 수율 및 색도 측정 결과는 Table 1과 같다. EtOH를 사용한 톳 추출물의 수율은 11.40%, MeOH를 사용한 경우의 수율은 17.95%, 증류수를 사용한 초고압 추출조건에서는 45.62%로 나타났다. 각 용매에 따른 톳 추출물의 수율을 비교하면 초고압 증류수> 80% MeOH> 70% EtOH 용매 순으로 톳 추출물의 수율이 많은 것으로 나타났으며, 특히 초고압 증류수 추출의 경우 다른 추출방법 보다 약 2.5배 정도 추출물 획득 수율이 향상되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Kwon and Youn (2015)의 추출방법에 따른 톳 추출물의 연구와 유사한 경향을 보였는데, 톳은 섬유질이 많아 일반적인 용매로 추출한 방법으로는 용출되지 않았던 다양한 물질들이 초고압 처리를 통

해 조직과 세포막의 변형으로 인해 용매들이 세포 안으로 쉽게 들어감으로서 기존 물질들의 용출량이 증가할 뿐만 아니라 새로운 물질도 용출되어 수율이 높게 나타나는 것으로 생각된다 (Kwon and Youn, 2015).

톳 추출물 제조 시 추출 용매를 달리한 각 추출물의 색도를 측정한 결과, 명도를 나타내는 L (lightness)값의 경우 EtOH 추출물은 47.00로 가장 낮은 값을 나타냈으나, MeOH 및 초고압 증류수 추출물은 71.48 및 76.57로 높은 경향을 보였으며, 각 첨가량 간에 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 적색도를 나타내는 a (redness)값은 EtOH 추출물이 17.02로 가장 높았고, MeOH 추출물이 4.48로 가장 낮았다. 또한 황색도를 나타낸 b (yellowness)값은 초고압 증류수 추출물이 45.69로 가장 낮았으나, EtOH 및 MeOH 추출물은 57.01 및 58.91로 높은 값을 나타내었다. Lee et al. (2016)은 갈조류인 톳에는 Chlorophyll A&C, β-carotene 및 fucoxanthin 등 여러 색소들이 다량 함유되어 있어 가열 처리 시 톳의 색소들이 용출된다고 보고하였고, Kwon and Youn (2015)은 추출방법에 따른 톳 추출물의 성분 및 추출양에 차이가 있다고 보고하였다. 따라서, 톳 추출물 제조 시 추출 방법 및 추출 용매에 따라 톳에 함유되어 있는 다양한 천연 색소 및 생리활성물질의 용출 유무 및 용출양의 차이에 따라 각 추출물의 색도 결과에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

톳 추출물의 Total polyphenol 및 Total flavonoid 함량 분석

톳 추출물 제조 시 추출 용매를 달리한 톳 추출물들의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 톳을 70% EtOH로 추출한 톳 추출물의 총 폴리페놀 함량은 13.04 mg GAE/g이고, 80% MeOH 톳 추출물은 24.06 mg GAE/g, 초고압 증류수 톳 추출물은 6.91 mg GAE/g로 확인되었다. 즉, 톳 추출물의 폴리페놀 함량은 MeOH> EtOH> 증류수 추출물 순으로 폴리페놀 함량이 높게 나타났다. Lee (2013)는 톳 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량은 46.59 mg/g으로 보고하였으나, Kim et al. (2015)은 톳의 에탄올 추출물은 19.89 mg/g, 열수 추출물은 16.44 mg/g으로 보고하여 본 연구에서 측정한 톳 추출물의 폴리페놀 함량과 다소 차이가 나는 것으로 나타났다. 이러한 결과의 차이는 톳의 채취 시기, 장소, 추출 방법 및 용매 등에 따라 다소 차이가 발생하는 것으로 생각된다. 한편, 각종 용매에 따라 추출한 톳 추출물의 총 플라보노

Table 1. Comparison of the extraction yields and color values of various solvent extracts from *Hizikia fusiformis*

Sample	Yield (%)	Color value		
		Lightness (L)	Redness (a)	Yellowness (b)
70% EtOH extract	11.40	47.00±0.17 ^{a,1,2}	17.02±0.05 ^a	57.01±0.05 ^b
80% MeOH extract	17.95	71.48±0.20 ^b	4.48±0.08 ^c	58.91±0.04 ^a
Water extract	45.62	76.57±0.06 ^a	10.62±0.05 ^b	45.69±0.06 ^c

¹Value are mean±SD (n=3). ²Means with different letters in a column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

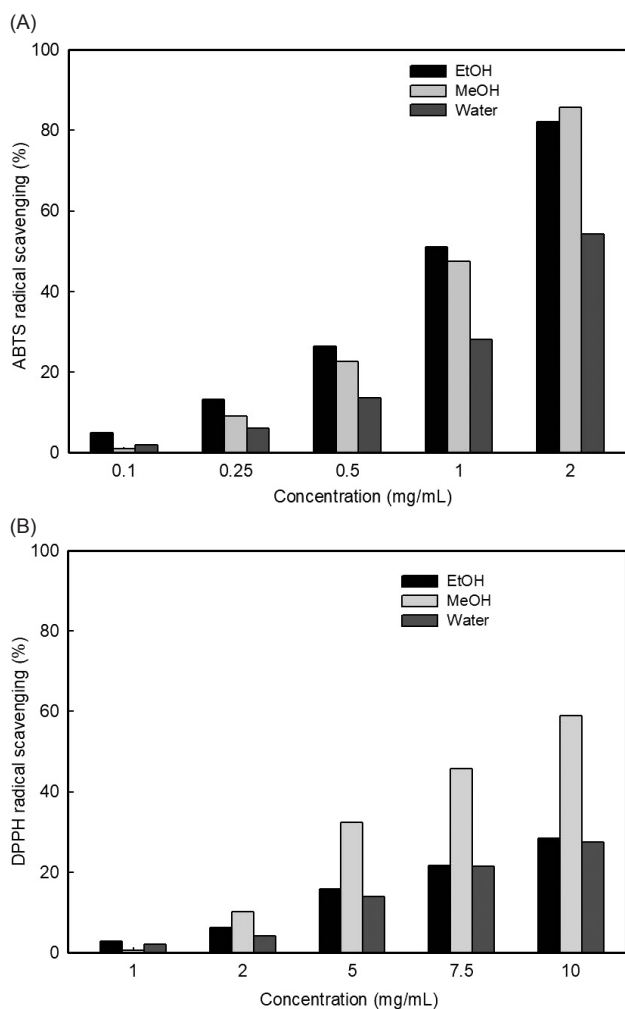


Fig 1. ABTS (A) and DPPH radical scavenging activities (B) of various solvent extracts from *Hizikia fusiformis*. ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

이드 함량은 7.99-8.43 mg QE/g으로 톳 추출물 제조 시 추출용매에 따른 총 플라보노이드 함량의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 톳 추출물 제조 시 추출 용매에 따라 총 폴리페놀의 용출량은 차이가 있지만 총 플라보노이드의 용출량은 추출 용매에 따른 차이는 없는 것으로 확인되었다. 플라보노

이드는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있어 폴리페놀에 비하여 플라보노이드는 추출 용매에 따른 용출량의 차이는 적은 것으로 생각된다(Middleton and Kandaswami, 1994).

톳 추출물의 항산화 활성

톳 추출물 제조 시 추출 용매로 70% EtOH, 80% MeOH 및 증류수를 사용한 톳 추출물들의 농도에 따른 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과는 Fig. 1에 나타내었고, 각 추출물의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성에 관한 IC_{50} 는 Table 3와 같다. 각 용매 별 톳 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성의 경우 추출물의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였다. 톳 추출물의 농도가 0.1-1 mg/mL의 농도의 범위에서는 EtOH 추출물이 가장 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 나타냈으나, 2 mg/mL 농도에서는 MeOH 추출물이 EtOH 추출물보다 약간 높은 활성을 보였다. ABTS 라디칼 소거활성의 IC_{50} 는 EtOH 추출물, 0.90 mg/mL; MeOH 추출물, 0.96 mg/mL; 증류수 추출물, 1.64 mg/mL 순으로 나타나, ABTS 라디칼 소거활성은 EtOH > MeOH > 증류수 추출물 순으로 높은 것으로 확인되었다.

각 추출용매 별 톳 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Fig. 1B에 나타난 것과 같이 각 추출물의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보여준다. 10 mg/mL 농도에서 각 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과 80% MeOH 추출물의 경우 58.87%의 소거 활성을 보였으나, EtOH 및 증류수 추출물에서는 각각 28.50%, 27.57%로 나타나, MeOH 추출물의 약 50%에 불과한 것으로 확인되었다. 더구나, DPPH 라디칼 소거활성의 IC_{50} 는 MeOH 추출물, 8.09 mg/mL; 증류수, 20.93 mg/mL; EtOH 추출물, 23.20 mg/mL인 것으로 확인되어 DPPH

Table 2. Total polyphenol and total flavonoid contents of various solvent extracts from *Hizikia fusiformis*

Sample	Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)
70% EtOH extract	13.04±0.53 ^{b,1,2}	7.99±0.22 ^a
80% MeOH extract	24.06±0.50 ^a	8.34±0.39 ^a
Water extract	6.91±0.05 ^c	8.43±0.09 ^a

¹Values are mean±SD (n=3). ²Means with different letters in a column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. Antioxidant activities of various solvent extracts from *Hizikia fusiformis*

Sample	ABTS (IC_{50} , mg/mL) ¹	DPPH (IC_{50} , mg/mL)	Reducing Power (EC_{50} , mg/mL) ²	FRAP value (mM)
70% EtOH extract	0.90	23.20	0.64	0.21
80% MeOH extract	0.96	8.09	0.40	0.28
Water extract	1.64	20.93	1.30	0.13

¹The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values (mg/mL) were calculated from a log dose inhibition curve. ² EC_{50} value for reducing power is expressed as the effective concentration at which the absorbance is 0.5.

라디칼 소거활성은 MeOH > 증류수 > EtOH 추출물 순으로 높은 것으로 확인되었다. Kim et al. (2015)은 톳 열수 추출물 및 에탄올 추출물 1 mg/mL 농도의 ABTS 라디칼 소거능은 각각 30.89% 및 38.69%이었으나, DPPH 라디칼 소거능은 두 추출물 모두 0-5% 정도의 미미한 활성만이 나타난다고 보고하였고, Siriwardhana et al. (2003)은 톳 추출물의 라디칼 소거활성은 추출용매 의존적이라고 보고하여, 본 연구에서 다양한 용매로 추출한 톳 추출물들의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성 결과와 유사한 것으로 나타났다.

EtOH, MeOH 및 증류수로 추출한 톳 추출물의 환원력(reducing power) 및 FRAP value를 측정한 결과는 Table 3에 나타내었다. 각 추출용매(MeOH, EtOH, 증류수)에 따른 톳 추출물의 환원력은 전체적으로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며(결과 생략), 각 추출용매 별 톳 추출물의 환원력(EC₅₀, mg/mL)은 MeOH 추출물이 0.40 mg/mL이고, EtOH 추출물은 0.64 mg/mL, 증류수 추출물은 1.30 mg/mL로 나타났다. 즉, 톳 추출물의 환원력은 MeOH > EtOH > 증류수 추출물 순으로 높은 것으로 확인되었다. 추출용매에 따른 톳 추출물의 FRAP value를 측정한 결과는 MeOH 추출물은 0.28 mM, EtOH 추출물은 0.21 mM, 증류수 추출물은 0.13 mM로 나타났다. 실험 결과 MeOH > EtOH > 증류수 추출물 순으로 FRAP value가 높았다. 이는 총 폴리페놀 함량이 환원력 및 FRAP value의 결과와 비슷한 경향을 나타내었는데, 총 폴리페놀 함량과 환원력 및 FRAP value와 밀접한 관계가 있다고 보고한 Lee et al. (2014)의 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다.

Tyrosinase 및 α-glucosidase 저해 활성

추출용매에 따른 톳 추출물의 tyrosinase 저해활성(%)으로 살펴본 미백효과와 α-glucosidase 저해활성으로 살펴본 항당뇨 효과에 대한 비교·분석 결과는 Table 4에 나타내었다. Tyrosinase는 피부의 표피 기저층에 존재하는 멜라노 사이트에서 tyrosine을 산화시켜 멜라닌의 생성을 촉진시키는 효소로서 이들의 활성 억제는 피부 미백과 노화 방지에 매우 중요하다(Choi et al., 2011). 따라서 피부의 멜라닌 색소 침착 제어 및 억제와 밀접한 관련이 있는 tyrosinase inhibitor는 의학 및 화장품 분야에서 관심이 증가하는 추세이다. 각 용매 별 톳 추출물은 5 mg/mL의 농도에서 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 EtOH 추출물은

51%, MeOH 추출물은 24%, 초고압 증류수 추출물은 20%의 저해 활성을 나타내었고, 위의 3가지 추출용매 중 EtOH를 용매로 추출한 톳 추출물의 tyrosinase 저해 활성이 가장 높은 것으로 확인되었다. Choi et al. (1998)은 톳 메탄올 추출물이 1 mg/mL 농도에서 24%의 tyrosinase 저해활성을 나타낸다고 보고하였고, Jeon et al. (2012)은 톳 에탄올 추출물 0.1 mg/mL 농도에서 44%의 tyrosinase 저해활성을 나타낸다고 보고하였으며, Kwon and Youn (2017)은 톳 초고압 추출물 1 mg/mL 농도에서 40%의 tyrosinase 저해활성을 나타낸다고 보고하여, 본 연구 결과와 다소 차이가 나는 것으로 확인되었다. 이러한 tyrosinase 저해활성의 차이는 톳의 채취 장소 및 계절, 보관 기간 및 방법을 비롯하여 톳 추출물의 추출용매, 추출방법 및 tyrosinase 저해활성 측정방법 등의 차이에서 오는 결과로 생각된다.

당뇨병은 고혈당 상태가 지속되는 질환으로 이환율이 높고 고혈당 상태의 지속에 따른 다양한 합병증으로 인한 사망률이 높은 만성 퇴행성 대사 질환이다(Ali et al., 2017). α-Glucosidase는 소장 점막의 brush-border membrane에 존재하는 효소로 음식물 중의 전분을 포도당과 같은 단당으로 분해하는 역할을 담당하는 효소로 당뇨병의 핵심적인 효소이다(Kim et al., 2014). 당뇨병을 억제하기 위하여 다양한 추출용매를 사용한 톳 추출물의 α-glucosidase 저해 활성을 측정하여 혈당상승 억제제로서 활용 가능성을 검토하였다. EtOH, MeOH 및 증류수로 추출한 톳 추출물은 5 mg/mL 농도에서 α-glucosidase 저해 활성을 측정한 결과 EtOH 추출물은 37.20%, MeOH 추출물은 4.07%이었으나, 초고압 증류수 추출물에서는 0.33%로 저해 활성이 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Kim et al. (2015)의 톳 추출물의 α-glucosidase 저해 활성 연구에서 열수 추출물은 약 4%, EtOH 추출물은 약 40% 저해활성이 있는 것으로 보고하여 본 연구 결과와 상대적으로 유사한 결과를 보였다.

톳 추출물의 항치매 효과

치매는 신경세포의 노화에 의한 퇴행성 뇌질환으로 뇌혈관성 치매와 알츠하이머병으로 분류한다. 뇌혈관성 치매는 그 원인이 명확히 구명되어 있어 진단 및 치료가 용이하지만, 알츠하이머병은 정확한 발병 기전과 원인이 밝혀져 있지 않다(Park et al., 2014). 이 질병의 원인 중 하나인 이상단백질 축적설은 β-amyloid라는 40-42개의 아미노산으로 구성된 펩타이드가 과도하게 만들어져 뇌세포에 축적되면, 뇌의 신경세포 기능이 떨어져서 알츠하이머병이 발생한다고 추정하고 있다. β-Amyloid는 amyloid precursor protein (APP)의 베타와 감마 부위가 각각 β-secretase와 γ-secretase라는 효소에 의해 절단되어 생성된다(Park et al., 2014). 본 연구에서는 알츠하이머병을 억제하기 위하여 톳 추출물의 APP의 베타 부위를 절단하는 BACE1 (β-secretase)의 저해 활성을 측정하여 알츠하이머병의 예방 및 억제활성을 검토하였다. 추출 용매에 따른 톳 추출물의 각 농도 별 BACE1의 저해 활성을 측정한 결과 및 IC₅₀는 Fig. 2와

Table 4. Tyrosinase, α-glucosidase and BACE1 inhibitory activities of various solvent extracts (5 mg/mL) from *Hizikia fusiformis*

Sample	Inhibitory activity (%)		
	Tyrosinase	α-Glucosidase	BACE1
70% EtOH extract	51.00±1.37 ¹	37.20±0.17	100.13±0.23
80% MeOH extract	24.33±12.11	4.07±0.03	68.10±0.10
Water extract	20.36±3.49	0.33±0.49	110.00±0.90

¹Values are mean±SD (n=3).

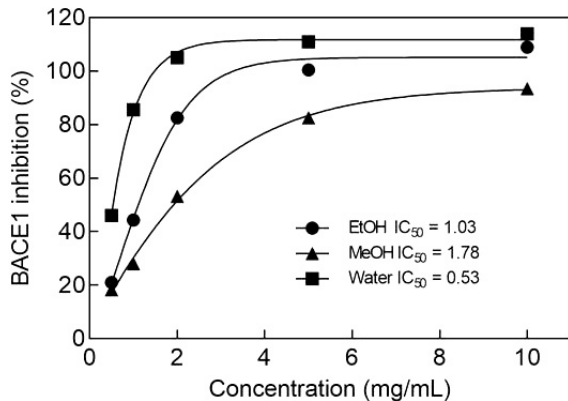


Fig 2. BACE1 (β -secretase) inhibitory activities of various solvent extracts from *Hizikia fusiformis*.

Table 4에 나타내었다. 각 용매 별 톳 추출물의 BACE1 저해 활성은 각 추출물의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였다. 톳 추출물 1.0 mg/mL의 농도에서 BACE1의 저해 활성을 측정할 결과 EtOH 추출물은 43%, MeOH 추출물은 26%, 증류수 추출물은 83%로 나타나, 증류수 추출물이 가장 높은 저해 활성을 보였다. 각각의 톳 추출물의 BACE1 저해 활성의 IC_{50} 은 EtOH 추출물을 1.03 mg/mL, MeOH 추출물은 1.78 mg/mL, 증류수 추출물은 0.53 mg/mL로 나타나, 증류수 > EtOH > MeOH 추출물 순으로 BACE1 저해활성이 높은 것으로 확인되었다. Son et al. (2016)은 해조류 추출물의 항치매 연구에서 다양한 해조류 추출물 중 감태 및 검등 감태 추출물 1 mg/mL 농도에서 약 80%의 BACE1 효소 활성을 저해한다고 보고하였고, Choi et al. (2017)은 톳니모자반에서 추출한 meroterpenoids는 BACE1 효소 활성 억제를 통해 베타 아밀로이드의 생성을 줄인다고 보고하였다. 한편 Wagle et al. (2018)은 톳 추출물의 BACE1 저해활성연구에서 메탄올로 추출한 톳 추출물에서 BACE1 효소 활성을 저해(IC_{50} : 152.72 μ g/mL)한다고 보고하였다. 본 연구에서 확인한 톳 메탄올 추출물의 BACE1 저해활성과의 차이는 톳 추출물 제조 시 톳의 채취 시기 및 장소를 비롯하여 추출용매의 종류, 추출용매의 농도, 추출방법 및 BACE1 저해활성 측정 방법 등의 차이에서 오는 결과로 생각된다. BACE1 효소 활성 억제 물질을 함유하고있는 것으로 확인된 톳은 치매 예방을 위한 건강 기능성식품소재 및 의약품 소재로의 활용 가능성이 높을 것으로 판단되며, 향후 톳으로부터 항치매 물질에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

사 사

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구사업임(2017R1D1A3B03029803).

References

- Ali MY, Kim DH, Seong SH, Kim HR, Jung HA and Choi JS. 2017. α -Glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of plastoquinones from marine brown alga *Sargassum serratifolium*. Mar Drugs 15, 368. <https://doi.org/10.3390/md15120368>.
- Benzie IFF and Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem 239, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181, 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Byun HG and Kim SK. 2005. Development of physiological activity and health functional materials of seaweed. Susan-yeon-gu 22, 1-10.
- Cho EK and Choi, YJ. 2010. Physiological activities of hot water extracts from *Ecklonia cava* kjellman. J Life Sci 20, 1675-1682. <https://doi.org/10.5352/JLS.2010.20.11.1675>.
- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES and Lee NH. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. Korean J Pharmacogn 29, 237-242.
- Choi JH, Kim JS, Jo BS, Kim J, Park HJ, An BJ, Kim M, Cho YJ. 2011. Biological activity in functional cosmetic purple sweet potato extracts. Korean J Food Preserv 18, 414-422. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2011.18.3.414>.
- Choi MW, Jung CG, Kim HR and Kim JI. 2017. Effect of *Sargassum serratifolium* extracts on β -amyloid production. Korean J Fish Aquat Sci 50, 85-91. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0085>.
- Cui YR, Kim HS, Je JG, Wang L, Oh JY, Jia L and Jeon YJ. 2019. Protective effects of antioxidant active fractions derived from the edible seaweed *Hizikia fusiformis* in oxidatively stressed human dermal fibroblasts. Korean J Fish Aquat Sci 52, 35-42. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0035>.
- Iida K, Hase K, Shimomura K, Sudo S, Kadota S and Namba T. 1995. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. Planta Med 61, 425-428. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-958129>.
- Jeon MJ, Kim M, Jang HJ, Lee SW, Kim JH, Kim HS and Lee SH. 2012. Whitening effect of *Hizikia fusiformis* ethanol extract and its fractions. J Life Sci 22, 889-896. <https://doi.org/10.5352/JLS.2012.22.7.889>.
- Kim JH, Kang HM, Lee SH, Lee JY and Park LY. 2015. Antioxidant and α -glucosidase inhibition activity of seaweed extracts. Korean J Food Preserv 22, 290-296. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2015.22.2.290>.
- Kim MJ, Lee HH, Seo MJ, Kang BW, Park JU and Jeong YK. 2013. Antioxidation activities of organic solvent fractions obtained from seaweed, *Hizikia fusiformis*. J Life Sci 23, 361-367. <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.3.361>.

- Kim PH, Kim MJ, Kim JH, Lee JS, Kim KH, Kim HJ, Jeon YJ, Heu MS and Kim JS. 2014. Nutritional and physiologically active characterizations of the sea squirt *Halocynthia roretzi* sikhae and the seasoned sea squirt. Korean J Fish Aquat Sci 47, 1-11. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0001>.
- Kim SH, Lim SB, Ko YH, Oh CK, Oh MC and Park CS. 1994. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. Korean J Fish Aquat Sci 27, 462-468.
- Kwon MS, Mun OJ, Bae MJ, Lee SG, Kim MH, Lee SH, Yu KH, Kim YY and Kong CS. 2015. Anti-inflammatory activity of ethanol extracts from *Hizikia fusiformis* fermented with lactic acid bacteria in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr 44, 1450-1457. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.10.1450>.
- Kwon YR and Youn KS. 2015. Quality characteristics of *Hizikia fusiforme* extracts with different extraction method. Korean J Food Preserv 22, 70-77. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2015.22.1.70>.
- Kwon YR and Youn KS. 2017. Antioxidant and physiological activities of *Hizikia fusiforme* by extraction methods. Korean J Food Preserv 24, 631-637. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2017.24.5.631>.
- Lee KW, Kim YS, Park PJ, Jeong JH. 2014. Comparison of effect of water and ethanolic extract from roots and leaves of *Allium hookeri*. J Korean Soc Food Sci Nutr 43, 1808-1816. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.12.1808>.
- Lee NY. 2013. Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 42, 1893-1898. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.12.1893>.
- Lee SH. 2011. Current status and prospect of nutraceuticals from marine algae. Bull Food Technol 24, 165-175.
- Lee YJ, Kim WS, Jeon YJ and Kim YT. 2020a. Physicochemical properties and antioxidant activities of the yanggaeng containing *Hizikia fusiformis* powder. Korean J Fish Aquat Sci 53, 588-596. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0588>.
- Lee YJ, Kim WS, Jeon YJ and Kim YT. 2020b. Physicochemical properties and antioxidant activities of the yanggaeng containing *Pyropia yezoensis*. Korean J Fish Aquat Sci 53, 672-680. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0672>.
- Lee YJ, Kim WS, Lee BJ, Jeon YJ and Kim YT. 2017. Quality characteristics and antioxidant activities of gruel Containing *Saccharina japonica* powder. Korean J Fish Aquat Sci 50, 707-713. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0707>.
- Lee YJ, Lim SY, Kim WS and Kim YT. 2016. Processing and quality characteristics of glutinous barley gruel containing *Hizikia fusiformis*. Korean J Fish Aquat Sci 49, 310-316. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0310>.
- Lee YJ. 2017. Expression, purification and characterization of BACE1 (β -secretase) in *E. coli*. M.S. Thesis, Kunsan National Univeristy, Gunsan, Korea.
- Middleton E and Kandaswami C. 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. Food Technol 48, 115-119.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol 71, 109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0).
- Oyaizu N, Yasumizu R, Miyama-Inaba M, Nomura S, Yoshida H, Miyawaki S, Shibata Y, Mitsuoka S, Yasunaga K and Morii S. 1988. (NZW×BXSb) F1 mouse. A new animal model of idiopathic thrombocytopenic purpura. J Exp Med 167, 2017-2022. <https://doi.org/10.1084/jem.167.6.2017>
- Park SJ, Tai S, Lee YJ and Kim YT. 2014. Overexpression and refolding of BACE2. Korean J Fish Aquat Sci 47, 370-375. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2014.0370>.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang Min and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Bio Med 26, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Shetty K, Curtis OF, Levin RE, Witkowsky R and Ang V. 1995. Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas spp.* J Plant Physiol 147, 447-451. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82181-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82181-4).
- Siriwardhana N, Lee KW, Kim SH, Ha JW and Jeon YJ. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. Food Sci Tech Int 5, 339-346. <https://doi.org/10.1177/1082013203039014>.
- Son HJ, Um MY, Kim I, Cho S, Han D and Lee C. 2016. In vitro screening for anti-dementia activities of seaweed extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 45, 966-972. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.7.966>.
- Statistics Korea. 2020. Fishery production survey. Retrieved from <http://kosis.kr> on Jun 18, 2020.
- Wagle A, Seong SH, Zhao BT, Woo MH, Jung HA and Choi JS. 2018. Comparative study of selective in vitro and in silico BACE1 inhibitory potential of glycyrrhizin together with its metabolites, 18 α - and 18 β -glycyrrhetic acid, isolated from *Hizikia fusiformis*. Arch Pharm Res 41, 409-418. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1018-2>.
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H and Niki R. 1997. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). Biosci Biotech Biochem 61, 177-178. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.177>.