

제주 용암해수를 용매로 한 제주 작물 추출물의 항산화 효능

박아름이 · 이연지 · 강나래 · 강도형 · 허수진

Antioxidant efficacy of Jeju crop extracts using Jeju lava seawater as a solvent

Areumi Park · Yeon-Ji Lee · Nalae Kang · Do-Hyung Kang · Soo-Jin Heo

Received: 27 October 2022 / Revised: 15 November 2022 / Accepted: 16 November 2022
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Jeju lava seawater's abundant minerals are known to exert antioxidant effects that remove the free radicals responsible for aging. Therefore, lava seawater reportedly possesses high commercial value as a functional food material. This study compared and analyzed the antioxidant activities of extracts from crops produced in Jeju (carrots, blueberries, and mandarins) using distilled water and lava seawater as solvents. Lava seawater extracts exhibited higher total polyphenol and flavonoid contents of blueberries and mandarins than distilled water extracts. Furthermore, the antioxidant enzymatic and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of these crops were higher in lava seawater extracts than in distilled water extracts. In particular, using Vero cells, the ROS-scavenging efficacies of blueberries and mandarins were found to be higher in lava seawater extracts. Meanwhile, the antioxidant activities of carrots were higher in lava seawater extracts, despite no difference in total polyphenol and flavonoid contents. These results suggest that lava seawater exhibits favorable potential as a solvent in the functional food industry, and lava seawater-based Jeju crop extracts are potentially useful as functional food ingredients.

Keywords Lava seawater extracts, Carrot, Blueberry, Mandarin, Antioxidant, Vero cell

A. Park · Y.-J. Le · N. Kang · D.-H. Kang · S.-J. Heo (✉)
한국해양과학기술원 제주특성연구센터
(Jeju Marine Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology (KIOST), Jeju 63349, Republic of Korea)
e-mail: sjheo@kiost.ac.kr

서론

제주 동부 한동리에서 발견된 용암해수는 해수가 현무암 지반에 의해 자연 여과되어 육지의 지하로 스며들며 생성된 지하수 자원이다. 용암해수는 나트륨(Na), 마그네슘(Mg), 칼슘(Ca) 등의 필수 미네랄과 바나듐, 셀레늄, 게르마늄 등의 희귀 미네랄 성분이 일반 해수보다 높다고 알려져 있다(Jang et al. 2016; Ma et al. 2017). 또한, 해양 심층수에 비해 취수 비용이 매우 저렴하여 산업적 활용이 용이하다(Jang et al. 2016; Ma et al. 2017). 용암해수는 경도(Degree of hardness, mg/L)에 따라 단물(soft, 0-60 mg/L), 약한물(moderately hard, 60-120 mg/L), 센물(hard, 120-180 mg/L), 대단히 센물(very hard, 180 mg/L 이상)로 분류되고 있다(Jung et al. 2017; World Health Organization 2010). 미네랄 음료 조성물의 기호성 관능 평가 결과에 따르면 경도가 100 mg/L 또는 200 mg/L인 미네랄워터가 전반적으로 높은 기호성을 나타내었으며(Kang et al. 2008), 현재 시판되는 용암수의 경우에도 100~200 mg/L의 경도가 가장 많이 활용되고 있다(www.jejulavawater.com). 용암해수는 유해성분이 검출되지 않으며, 암세포의 성장을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다(Kang et al. 2008). 또한, 노화의 원인인 활성산소를 제거하는 항산화 효과를 비롯하여, 항당뇨, 체지방 감소, 피부개선 등 다양한 효과가 있다고 보고되어 있다(Choi et al. 2020).

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 세포 신호 전달 및 면역 반응에서 중요한 역할을 하지만, 과잉 생산되면 생체 내 지질, 단백질 및 DNA와 반응하여 세포의 손상을 일으켜 노화, 암, 동맥경화, 당뇨 등 다양한 질병을 유발한다(Kim et al. 2017; Lee et al. 2018). 인체는 활성산소를 제거하거나 손상된 세포를 치유할 수 있는 항산화 체계를 갖추고 있으며, 그 중 항산화 효소계로서 superoxide dismutase (SOD), catalase

(CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등이 있다. 이와 같은 항산화 효소는 DNA의 산화적 손상을 완화하여 세포를 보호하는 역할을 한다(Chon et al. 2013; Kim et al. 2017). 항산화 효소를 활성화시키는 항산화제를 함유한 과일과 채소의 섭취는 세포 방어기제를 강화하고 세포 구성성분에 대한 산화적 손상을 예방하는데 도움이 될 수 있다(Wong et al. 2006).

제주산 과일 또는 채소의 항산화 효과에 관한 연구는 ‘제주산 진귤, 하귤, 온주밀감의 항산화 활성 비교(Hyon et al. 2010)’, ‘제주산 참다래의 품종 및 숙도에 따른 항산화 활성 비교(Oh et al. 2011)’, ‘제주산 청귤의 착즙액, 착즙박, 원물의 항산화 및 항균 활성 비교(Choi et al. 2019)’, ‘제주산 블루베리와 상동열매의 일반성분, 항산화 및 항증식 활성 비교(Ko et al. 2017)’, ‘제주산 당근과 벨기에산 파스닙의 항산화 활성 비교(Park et al. 2022)’ 등 다양하게 진행되고 있다. 한편, 현재까지 제주 물 산업 연구는 ‘제주 물의 기능성 및 혼합음료 개발 설정에 관한 연구(Ko et al. 2011)’, ‘삼다수의 당뇨병 치료 효과(Koh et al. 2013)’ 등 삼다수의 우수성에 관한 연구가 진행되었다. 최근에는 용암해수의 산업적 가치가 주목받으면서 ‘용암해수로 제조한 쿠키의 품질특성(Jung et al. 2017)’, ‘용암해수를 이용한 해조류, 식물 복합추출물의 숙취해소 효과(Shon et al. 2018)’ 등 용암해수를 기반으로 한 식품 관련 연구뿐만 아니라, ‘제주 용암해수의 배양액 첨가가 L6 근육세포 포도당수송 활성에 미치는 영향(Ma et al. 2017)’ 등 용암해수의 안전성 및 생리활성에 관한 연구들이 진행되고 있다. 그러나 용암해수를 추출용매로 활용한 제주산 작물의 기능성 평가 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 경도 100 mg/L와 경도 300 mg/L인 용암해수를 활용한 제주산 작물 추출물의 항산화 효능을 비교하여 최적의 경도 조건을 선정하였다. 또한 선정된 용암해수와 증류수를 각각 용매로 활용한 제주산 작물 추출물의 항산화 효능을 비교 분석함으로써 기능성소재로서 용암해수의 활용가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

작물 재료 및 추출물 제조

실험에 사용한 작물은 제주산 당근(Carrot, *Daucus* sp.), 블루베리(Blueberry, *Vaccinium* sp.), 감귤(Mandarin, *Citrus* sp.) 3종으로 선정하였으며, 각 작물은 제주도 소재의 농장 또는 농협(당근; 한스 에코팜, 블루베리; 한림 한경 강협 블루베리 공선회, 감귤; 서귀포 농협)에서 구매하였다. 각 작물을 증류수, 경도 100 또는 300 mg/L의 용암해수를 이용하여 2%의 농도로 제조하여 상온에서 24시간 동안 Shaking incubation하였다. 이후, 3200 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 감압 여과한 것을 추출물로 사용하였다. 정제수 추출물과 용암해수 추출물은 각각 Distilled water extracts (DWE), Lava

seawater extracts (LSE)로 표기하였다. 각 추출물의 수율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{추출 수율 (\%)} = (\text{추출 후 시료 무게} / \text{최초 시료 무게}) \times 100$$

DPPH 라디칼 소거활성

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은 Blois 방법(1958)을 변형하여 실험하였다. 각 농도별 0.5, 1, 2, 4 mg/mL로 각 추출물에 희석한 시료 20 μ L와 0.15 mM DPPH 용액 180 μ L를 96 well plate에 넣어주어 실온에서 30분간 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 계산은 A_a 는 농도별 시료를 포함한 실험군, A_b 는 blank를 포함한 대조군, A_c 는 시료를 포함하지 않은 대조군을 나타내며, 계산식은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} \text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = \{ [A_c - (A_a - A_b)] / A_c \} \times 100 \end{aligned}$$

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Denis 방법(1915)을 참고하여 Folin-ciocalteu method를 변형하여 측정하였다. 추출한 시료는 1 mg/mL을 0.1 mg/mL로 희석한 후, Test tube에 각 시료 500 μ L, 95% Ethanol 500 μ L와 2.5 mL의 증류수를 넣어주었다. 그 후 50% Folin-ciocalteu reagent 250 μ L를 넣고 5분 반응 후, 5% Na_2CO_3 500 μ L 넣고 60분 반응하였다. 반응이 끝난 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 그려 추출물의 총 폴리페놀 함량을 계산하였다. 총 폴리페놀 함량은 1 g 건조중량에 대한 mg gallic acid equivalents (GAE/g dry weight)로 환산하여 나타내었다. 플라보노이드 함량은 Davis 방법(1947)을 일부 변형하여 측정하였다. 2 mg/mL 농도의 추출물 20 μ L을 E-tube에 diethylene glycol 200 μ L, 1 N NaOH 20 μ L을 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 반응시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)을 표준물질로 하여 검량선을 작성하였고 플라보노이드 함량은 건조시료 중량당 mg quercetin equivalent (QE/g dry weight)로 나타내었다.

항산화 효소 활성(SOD, Catalase) 측정

Superoxide dismutase (SOD)

SOD 활성은 EZ-SOD assay kit (Dogenbio Co., Korea)를 사용하여 측정하였다. 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL 농도로 희석한 추출물을 sample well과 Blank2의 well에 20 μ L씩 넣어주고 Blank1와 Blank3 well에 증류수를 각각 20 μ L씩 넣어주었다.

각 well에 WST working solution 200 μ L을 넣고, Blank2와 Blank3의 well에 Dilution buffer를 20 μ L씩 넣어주었다. Enzyme working solution을 Blank1과 sample well에 각각 20 μ L씩 넣어준 후 Plate를 37°C에서 20분간 반응시켰다. Microplate reader (Biotek SynergyTM HT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{SOD activity (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{blank1}} - \text{OD}_{\text{blank3}}) - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank2}})}{(\text{OD}_{\text{blank1}} - \text{OD}_{\text{blank2}})} \times 100$$

Catalase (CAT)

CAT 활성은 EZ-Catalase assay kit (Dogenbio Co., Korea)를 사용하여 측정하였다. 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL 농도로 희석한 추출물을 25 μ L씩 넣어주었다. 40 μ M H₂O₂ 용액을 각 well에 25 μ L씩 넣은 후, Plate를 빛이 차단된 실온에 30분간 반응시켰다. 10 mM Oxi-Probe와 100 U/mL horseradish-peroxidase Working Solution을 50 μ L씩 넣은 후, 빛이 차단된 37°C에서 30분간 반응시켰다. Plate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Catalase activity (\%)} = \frac{\{\text{Blank} - (\text{Sample} - \text{Negative control})\}}{\text{Blank}} \times 100$$

세포배양

항산화 활성 검증 연구에 일반적으로 활용되는 원숭이 신장 상피세포인 Vero 세포를 사용하였다(Kang et al. 2018; Lyu et al. 2006). 세포배양 배지는 RPMI 1640에 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% Penicillin이 함유된 배지를 사용하였으며, 100 mm cell culture dish에 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 부착되도록 하였다.

세포독성(LDH release assay)

EZ-LDH kit (Dogenbio Co., Korea)를 사용하여 세포독성을 확인하였다. 세포독성을 측정하기 위해 배양 중인 Vero 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well seeding하여 16시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 각각의 추출물을 25, 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 1시간 배양한 후, 0.15 mM H₂O₂를 처리하였다. 24시간동안 incubator에서 반응시켰다. Lysis solution을 각 well에 10 μ L 넣어준 후, 세포 침전을 위해 원심분리 시켜 주었다. 상층액 10 μ L를 새로운 96 well plate에 옮겨준 후, LDH Reaction Mixture을 제조하여 각 well에 100 μ L씩 넣어주었다. 빛이 차단된 상온에서 30분간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH 활성 값은 아무것도 처리하지 않은 Control 값을 기준으로 100%로 값을 계산하여 비교하고자 하는 각 추출물들의 상대적 값을 비교하여 나타내었다.

ROS 소거 효능

세포 내 활성산소 소거 효과를 측정하기 위해 Vero 세포를 사용하였다. Vero 세포를 1×10^4 cells/well 로 96 well plate에 분주하여 16시간 배양 후, 각각의 추출물을 25, 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 1시간 배양한 후, 0.15 mM H₂O₂를 처리하였다. 30분간 배양한 후, DCF-DA를 처리하였다. 세포 내 자유라디칼 생성 정도는 λ excitation 485 nm, λ emission 528 nm 범위에서 DCF 형광 강도를 측정하였다. 또한, 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 형광현미경 관찰에 의한 ROS 생산 정도를 조사하기 위해 coverslip에 부착된 세포를 동일한 조건으로 처리하여 각각의 추출물을 50 μ g/mL 농도로 배양한 후, 0.15 mM H₂O₂를 처리하였다. 처리한 세포를 DCF-DA로 염색하여, PBS로 세척한 후 형광현미경(Nikon eclipse 80i, Japan)으로 관찰하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실험을 수행하였으며, 데이터는 평균 값과 표준오차로 나타내었다. DWE, LSE의 통계처리는 GraphPad Prism 9를 이용하였다. 각 시료들의 유의성 검정을 위해 각 실험군간 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며, Tukey test를 통해 사후 검정하였다(P < 0.05).

결과 및 고찰

용암해수 온도 선정

추출물 제조에 사용할 용암해수의 최적 온도를 선정하기 위해 온도 100 mg/L와 온도 300 mg/L의 용암해수를 이용하였다. 이를 활용하여 제조한 추출물인 LSE-100 및 LSE-300의 DPPH 라디칼 소거 활성을 비교 분석한 결과, 당근, 블루베리, 감귤 모두 LSE-300보다 LSE-100이 대체적으로 높은 활성을 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 항산화 효능과 기호성이 높은 용암해수 온도 100 mg/L를 선정하여 LSE-100을 제조하였으며, 이를 DWE와 비교 분석하였다(Fig. 1).

추출 수율

각 추출물을 동결 건조한 건조물의 수율 측정 결과는 Table 1와 같다. 각각 당근-DWE 61.6% \pm 1.63, 당근-LSE 66.2% \pm 0.46, 블루베리-DWE 71.1 \pm 0.93%, 블루베리-LSE 74.8 \pm 0.81%, 감귤-DWE 77.8 \pm 1.02%, 감귤-LSE 78.9 \pm 1.17%의 추출 수율을 나타내었으며, 당근, 블루베리, 감귤 모두 DWE에 비해 LSE가 비슷하거나 비교적 높은 수율을 나타내었다.

Table 1 Extraction yield, total polyphenol and total flavonoid contents of Jeju lava seawater-based crop extracts

Sample	Extraction yield (%)	Total polyphenol (mg GAE/g) ¹⁾	Total flavonoid (mg QE/g) ²⁾
Carrot	DWE	61.6 ± 1.63	29.62 ± 4.34
	LSE	66.2 ± 0.46	30.24 ± 1.49
Blueberry	DWE	71.1 ± 0.93	37.18 ± 2.30
	LSE	74.8 ± 0.81	42.76 ± 7.56
Mandarin	DWE	77.8 ± 1.02	92.34 ± 3.84
	LSE	78.9 ± 1.17	108.33 ± 6.45

¹⁾mg GAE/g: mg gallic acid equivalent per sample 1 g.

²⁾mg QE/g: mg quercetin equivalent per sample 1 g.

Data are shown as mean ± SE.

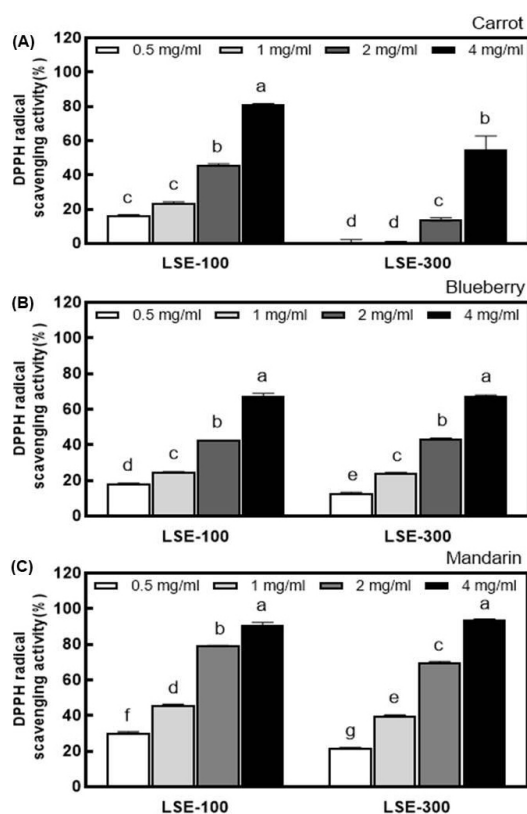


Fig 1 Comparison of the DPPH radical-scavenging activities of Jeju crop extracts between LSE-100 and LSE-300. (A) Carrot, (B) Blueberry, and (C) Mandarin. LSE-100: lava seawater extracts-hardness 100, LSE-300: lava seawater extracts-hardness 300. Data are presented as the mean ± SE. Lowercase letters (a, b, c, etc.) indicate significant differences ($p < 0.05$)

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀은 식물의 2차 대사산물인 페놀산, 플라보노이드, 리그닌, 멜라닌, 탄닌 등을 포함하는 화합물이며, 현재 8,000 개 이상의 페놀 구조가 알려져 있다(Kim et al. 2012; Soobrattee et al. 2005). 폴리페놀은 항균, 항염, 항알레르기, 항바이러스, 항암 등 다양한 생물학적 효과를 나타내며, 이러한 기능은

페놀이 갖고 있는 자유 라디칼 소거 및 항산화 활성에 근거하여 나타내는 것으로 알려져 있다(Kim et al. 2012). 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로 항산화 효과가 우수하여 노화방지와 생활습관 질병예방에 유용한 건강기능식품 소재로 알려져 있다(Han et al. 2013). 제주산 작물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 결과는 Table 1와 같다. 당근, 블루베리, 감귤의 LSE는 각각 3.83 ± 0.30 mg GAE/g, 10.26 ± 0.75 mg GAE/g, 12.11 ± 0.03 mg GAE/g의 총 폴리페놀 함량을 나타내었으며, 이는 대체적으로 DWE에 비해 높거나 비슷한 수치인 것으로 나타났다. Choi 등(2019)에 따르면 청굴 착즙액 및 착즙박, 청굴의 폴리페놀 함량은 12.70 mg GAE/g, 12.39 mg GAE/g, 12.36 mg GAE/g으로 감귤-LSE과 유사하게 나타났다. 또한, Lee 등(2006)은 추출방법에 따라 찌리 추출물의 폴리페놀 함량에 유의적인 차이를 나타낸다고 발표하였다. 따라서 용암해수를 이용한 추출기법이 제주산 작물 추출물의 폴리페놀 함량을 소량 증가시킨 것으로 판단된다. 한편 당근-LSE (30.24 ± 1.49 mg QE/g), 블루베리-LSE (42.76 ± 7.56 mg QE/g), 감귤-LSE (108.33 ± 6.45 mg QE/g)은 각각의 DWE과 대체적으로 비슷한 플라보노이드 함량을 나타내었다.

항산화 효소 활성

인체는 활성산소로부터 세포를 보호하기 위해 SOD, CAT, GPx 등의 항산화 방어시스템을 증가시킨다(Kim and Kim 2001). SOD는 superoxide를 hydrogen peroxide와 oxygen로 전환시키는 촉매 역할을 하며, CAT는 SOD 과정에 생성된 hydrogen peroxide를 H_2O 와 oxygen로 전환하는 역할을 한다(Lee et al. 2003; Lim et al. 2019). 제주산 작물 DWE 및 LSE의 SOD와 CAT 활성도를 비교 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 당근, 블루베리, 감귤 모두 전반적으로 DWE보다 LSE가 SOD 또는 CAT의 활성도가 높거나 유사한 것으로 나타났다. 블루베리의 경우, LSE가 DWE보다 0.125, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도에서 SOD 활성이 유의적으로 높은 것으로 나타났다($P < 0.05$). 당

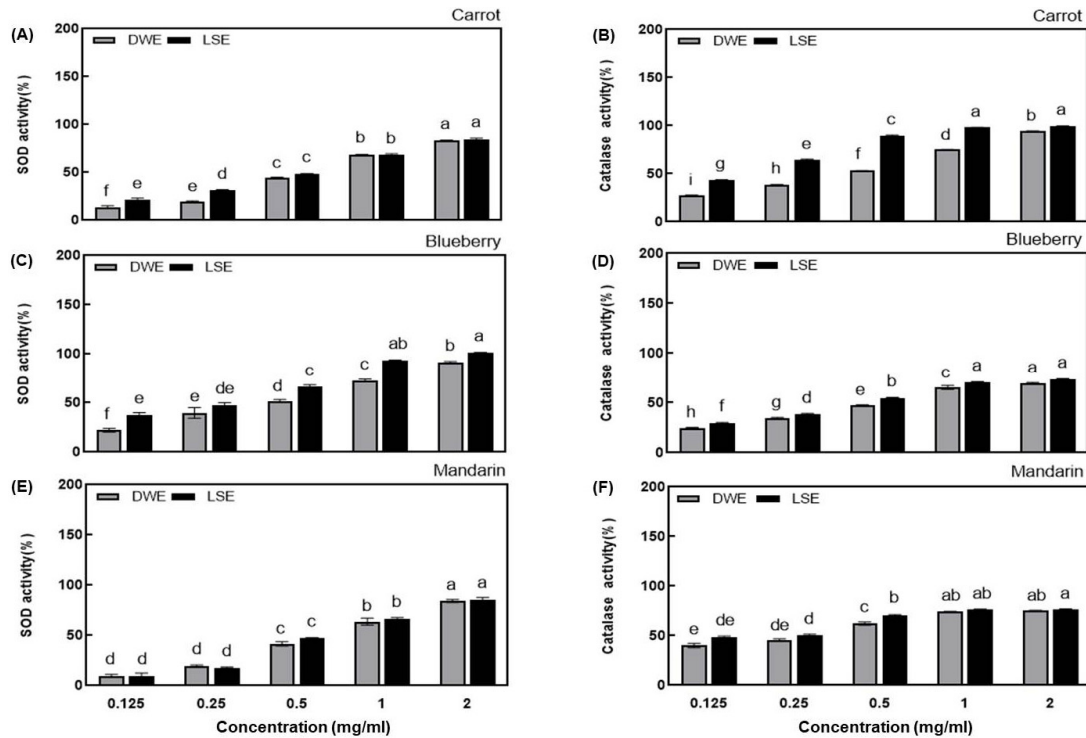


Fig 2 Effects of Jeju lava seawater-based crop extracts on antioxidant enzyme, (A, C, E) superoxide dismutase (SOD), and (B, D, F) catalase (CAT) activities. Enzyme activity was analyzed using the EZ-SOD (Dogenbio Co., Korea) and EZ-Catalase (Dogenbio Co., Korea) assay kits. (A and B) Carrot, (C and D) Blueberry, and (E and F) Mandarin. Data are presented as the mean ± SE. Lowercase letters (a, b, c, etc.) denote significant differences ($p < 0.05$)

근과 감귤에서는 DWE와 LSE의 SOD 활성이 유사한 것으로 나타났다. 또한, 당근과 블루베리의 경우, DWE보다 LSE가 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도에서 유의적으로 높은 CAT 활성도를 나타냈다($P < 0.05$). 감귤은 0.5 mg/ml의 DWE에서 CAT 활성의 차이가 나타났다. Sun 등(2018)은 블루베리의 과육과 껍질을 비교하였을 때, 껍질에서 폴리페놀의 일종인 안토시아닌 함량이 높았으며, 블루베리 껍질에서 SOD, CAT의 활성이 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 또한, Chung (2014)에 따르면, 2종의 베리 추출물 중, 폴리페놀의 함량이 높은 추출물이 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 따라서 블루베리-LSE가 블루베리-DWE보다 SOD 및 CAT 활성이 높게 나타난 것은 블루베리-LSE의 폴리페놀 함량이 블루베리-DWE보다 높기 때문인 것으로 판단된다. 마찬가지로 당근의 경우에도 용암해수 추출기법이 CAT 활성의 증가에 영향을 미쳤을 것이라고 판단된다.

DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 짙은 보라색을 나타내는 자유 라디칼로 항산화 물질에 의해 hydrogen radical 전자를 받아들이면서 라디칼이 소멸되어 짙은 보라색이 없어지는 특징을 가진다(Kim and Park 2011). 각 용매별 제주산 작물 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 비교하였다(Fig. 3 and Table 2). 당

근, 블루베리, 감귤 DWE와 LSE는 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하였다(Fig. 3). 또한, 당근-LSE는 $2.8 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, 블루베리-LSE는 $2.97 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$, 감귤-LSE는 $2.17 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 으로 모든 작물의 LSE가 DWE보다 낮은 IC_{50} 값을 나타냈다(Table 2). 특히, 당근과 감귤은 DWE보다 LSE가 유의적으로 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 보였다. Park 등(2022)에 따르면 당근의 DPPH 라디칼 소거능이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 12.51%를 나타내었다. 당근-LSE는 선행 연구된 당근 추출물보다 같은 농도에서 19% 가량 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 따라서 용암해수 추출기법이 DPPH 라디칼 소거활성의 향상에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

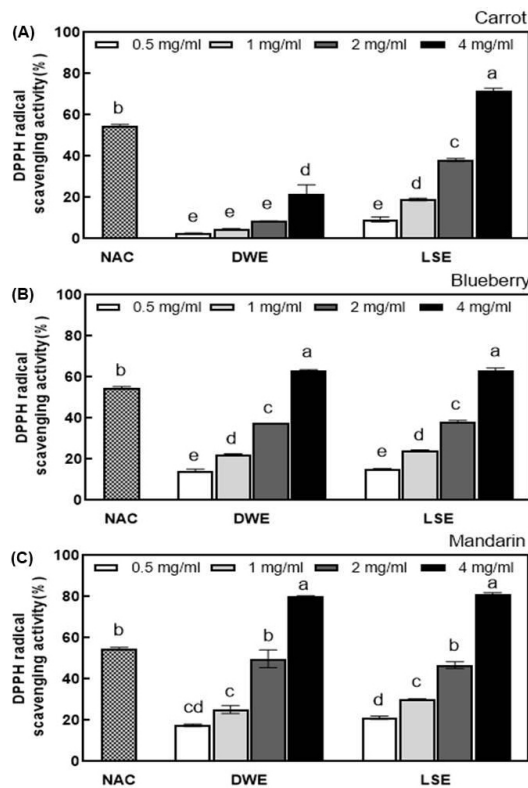
세포독성

당근, 블루베리, 감귤 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 각 추출물을 농도별로 처리하여 LDH (lactate dehydrogenase) 활성을 측정하였다(Fig. 4). 모든 추출물은 25 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 아무것도 처리하지 않은 Control와 비교하였을 때, 세포독성을 나타내지 않아 세포의 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 따라서 이후의 실험은 동일한 농도범위에서 진행하였다.

Table 2 DPPH radical scavenging activity of Jeju lava seawater-based crop extracts

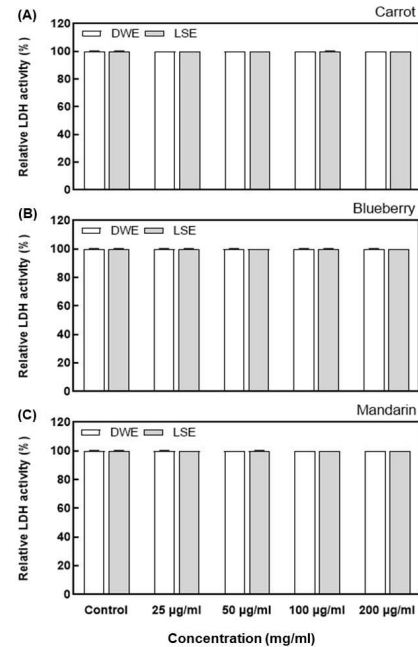
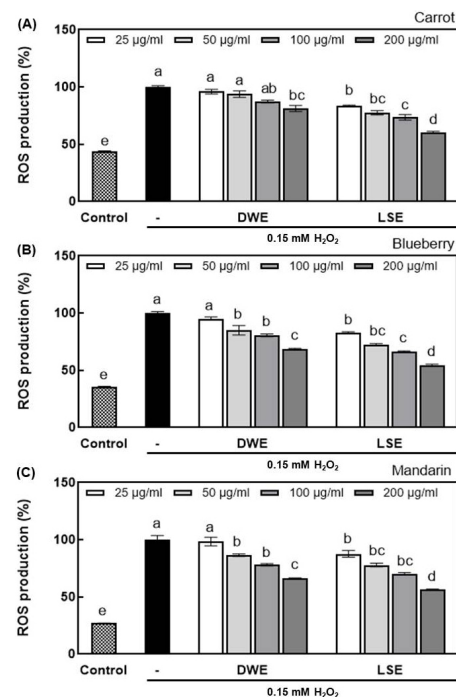
Sample	IC ₅₀ value ¹⁾ (mg/mL)	
Carrot	DWE	> 4
	LSE	2.80 ± 0.07
Blueberry	DWE	3.01 ± 0.03
	LSE	2.97 ± 0.04
Mandarin	DWE	2.25 ± 0.07
	LSE	2.17 ± 0.03

¹⁾IC₅₀ value: The concentration of sample required for 50% inhibition.

**Fig 3** DPPH radical-scavenging activities of Jeju lava seawater-based crop extracts. (A) Carrot, (B) Blueberry, and (C) Mandarin. N-acetylcysteine (NAC): 0.5 mg/mL. DWE: distilled water extracts, LSE: lava seawater extracts. Data are presented as the mean ± SE. Lowercase letters (a, b, c, etc.) signify significant differences (p < 0.05)

ROS 소거 효능

세포 내 ROS 소거 효능 평가를 위하여 DCF-DA를 사용하여 세포 내에 존재하는 활성 산소종을 측정하였다(Fig. 5). 소수성 물질인 DCF-DA는 세포 내 esterase에 의해 효소적으로 가수분해되어, 무형광 상태의 DCF-H로 분해된다. DCF-H가 ROS에 의해 산화되면 녹색 형광을 띠는 DCF로 변환되어, 이 형광 세기를 측정함으로써, 세포 내 ROS 농도를 측정할 수 있다(Choi et al. 2017; Lee et al. 2005). Vero 세포는 Control에

**Fig 4** Effect of Jeju lava seawater-based crop extracts on the relative activity of lactate dehydrogenase (LDH). LDH was analyzed using EZ-LDH (Cell Cytotoxicity Assay Kit). (A) Carrot, (B) Blueberry, and (C) Mandarin. Each bar represents the mean ± SE of each group**Fig 5** Intracellular ROS-scavenging activities of Jeju lava seawater-based crop extracts. Intracellular ROS were detected using the dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) method. ROS-induced DCF fluorescence in H₂O₂-treated Vero cells was compared with that in purified water and lava seawater. (A) Carrot, (B) Blueberry, and (C) Mandarin. DWE: distilled water extracts, LSE: lava seawater extracts. Data are presented as the mean ± SE. Lowercase letters (a, b, c, etc.) indicate significant differences (p < 0.05)

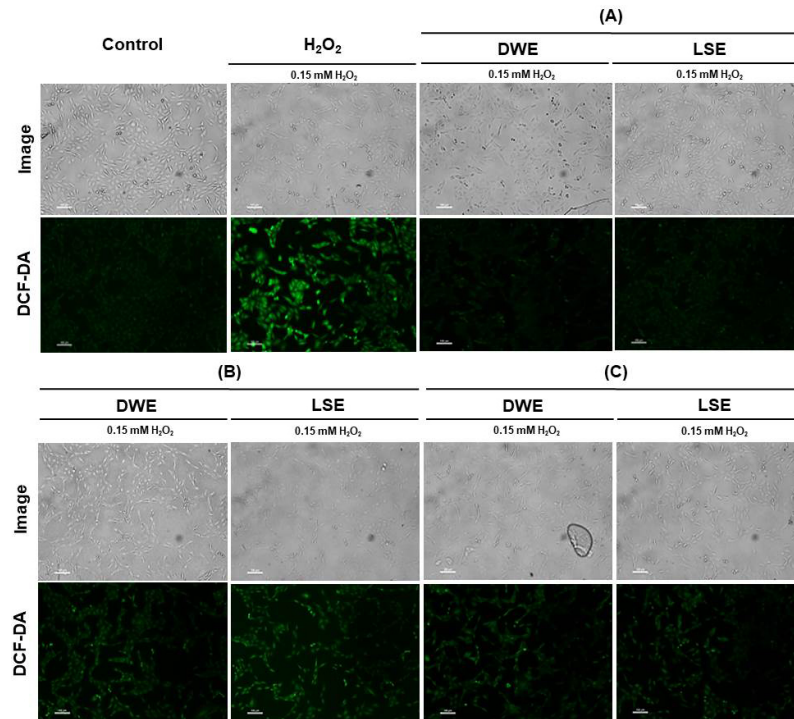


Fig 6 Inhibitory effects of lava seawater-based crop extracts on the H₂O₂-induced production of intracellular ROS. Vero cells were incubated in the presence or absence of H₂O₂. ROS levels were monitored using fluorescence microscopy. (A) Carrot, (B) Blueberry, and (C) Mandarin. DWE: distilled water extracts, LSE: lava seawater extracts. Control: normal control. H₂O₂: 0.15 mM H₂O₂ treatment. DWE, LSE: Carrots, blueberries, and mandarins were cultured at a concentration of 50 µg/mL and subsequently treated with 0.15 mM H₂O₂

대비하여 H₂O₂를 처리하였을 때 ROS 생성이 약 3배 증가하였다. 그러나 각각 LSE와 DWE를 25, 50, 100, 200µg/mL 농도로 전 처리한 경우, 농도 의존적인 ROS 소거 효능을 보였다 (Fig. 5). 또한, 각 추출물의 형광현미경 확인한 결과를 통해 H₂O₂ 만 처리하였을 때 형광강도는 매우 강하게 나타났으며 당근, 블루베리, 감귤을 50 µg/mL 농도로 처리하였을 때 Control와 유사하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 특히 모든 작물이 DWE보다 LSE에서 ROS 소거 효능이 우수하게 나타났으며, 25, 100 및 200 µg/mL의 농도에서는 유의적 차이를 나타내었다(Fig. 5). 이러한 결과를 통해 당근, 블루베리, 감귤 LSE가 세포 내 ROS 생산량을 감소시켜 산화적 스트레스를 억제시킴을 확인할 수 있었다. Huang 등(2016)은 블루베리의 안토시아닌 성분은 HUVEC 세포에서 ROS 소거 효능이 높으며, 여러 주요 단백질 수준을 변화시켜 산화 스트레스를 줄여주는 역할을 한다고 보고하였다. 따라서 블루베리와 감귤의 LSE가 DWE보다 우수한 ROS 생성 효능을 나타내는 것은 LSE의 폴리페놀 함량에 의한 것으로 판단된다.

적 요

제주 용암해수에 함유된 풍부한 미네랄은 노화를 유발하는

활성산소를 제거하는 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이에 용암해수는 기능성 식품소재로서 상업적 가치가 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 제주산 작물(당근, 블루베리, 감귤)추출물의 항산화 활성을 증류수 추출물과 용암해수 추출물을 이용하여 비교 분석하였다. 블루베리와 감귤의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 증류수 추출물보다 용암해수 추출물에서 더 높았다. 또한, 이들 작물의 항산화 효소 활성과 DPPH 라디칼 소거 활성은 증류수 추출물보다 용암해수 추출물에서 더 높았다. 특히, Vero 세포 이용한 블루베리와 감귤의 ROS 소거 효능은 용암해수 추출물에서 더 높게 나타났다. 한편, 당근의 항산화 활성은 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량에 차이가 없었음에도 불구하고 용암해수 추출물에서 더 높았다. 이러한 결과는 용암해수가 기능성 식품 산업에서 용매로서의 가능성이 있음을 시사하였으며, 용암해수를 이용한 제주산 작물 추출물은 기능성 식품의 원료로 사용될 수 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 “스마트특성화기반구축사업 (P0017240)”의 지원을 받아 수행된 연구결과이다.

References

- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Choi MH, Kim KH, Yook HS (2019) Antioxidant and antibacterial activity of premature mandarin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:622-629
- Choi SI, Lee S, Lee HJ, Kim BJ, Yeo J, Jung TD, Cho BY, Choi SH, Han X, Sim WS, Lee JH, Lee OH, Lee JS (2017) Antioxidant and anti-aging effects of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. in human dermal fibroblast. *Agriculture and Life Sciences Research Institute* 29:185-192
- Choi YP, Jand YB, Choi GS, Kwon MH, Lee DY, Kang BW, Rhee J, Seo BS, Kim DW, Choung JJ, Lee JY, Jang WG, Kang SW (2020) Neuroprotective Effects of Extract of Panax ginseng Sprouts Cultivated by Hydroponics Using Desalinated Magma Seawater of Jeju Island (Korea) Against Neurotoxicity In Vitro. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 49:925-939
- Chon SU, Kim DK, Kim YM (2013) Phenolics content and antioxidant activity of sprouts in several legume crops. *Korean Journal of Plant Resources* 26:159-168
- Chung HJ (2014) Comparison of total polyphenols, total flavonoids, and biological activities of black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 43:1349-1356.
- Davis W (1947) Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry* 19:476-478
- Folin O, Denis W (1915) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry* 22:305-308
- Han YL, Lee SY, Lee JH, Lee SJ (2013) Cellular flavonoid transport mechanisms in animal and plant cells. *Korean Journal of Food Science and Technology* 45:137-141
- Huang W, Zhu Y, Li C, Sui Z, Min W (2016) Effect of blueberry anthocyanins malvidin and glycosides on the antioxidant properties in endothelial cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016.
- Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH (2010) Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Korean journal of food and cookery science* 26:88-94
- Jang D, Hwang K-W, Park S-H, Kang D-H (2016) A study on the possibility of construction of live marine biotechnium (LMB) by using Jeju lava seawater. *Journal of Marine Business* 34:105-134
- Jeju Technopark Lava seawater Center. URL: <http://www.jejulava.com/drink.do>. Accessed 23 Sep. 2022
- Jung SH, Jeon S, Young M, Moon YJ, Hong YE, Kweon M (2017) Quality of cookies formulated with Jeju magma seawater. *Korean journal of food and cookery science* 33:292-299
- Kang N, Han EJ, Shin EJ, Han HJ, Lim JS, Lim DH, Ahn G (2018) Effects of Sterilization Process on Antioxidant Activity of Ethanol Extracts from *Saccharina japonica*. *J Chitin Chitosan* 23:44-50
- Kang SJ, Lee YD, Jeong CY (2008) The preparation method of mineral water using magma seawater. KR 10-0873841
- Kim AK, Kim JH (2001) Alterations of antioxidant enzymes in response to oxidative stress and antioxidants. *Journal of Applied Pharmacology* 9:249-257
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH (2012) Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean Journal of Food Science and Technology* 44:337-342
- Kim KB, Lee S, Heo JH, hee Kim J (2017) Neuroprotective effects of *Momordica charantia* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SK-N-MC cells. *Journal of Nutrition and Health* 50:415-425
- Kim MJ, Park EJ (2011) Feature analysis of different *in vitro* antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *Journal of the Korean society of food science and nutrition* 40:1053-1062
- Ko GA, Koh SY, Ryu JY, Cho SK (2017) Comparison of proximate compositions, antioxidant, and antiproliferative activities between blueberry and *Sageretia thea* (Osbeck) MC Johnst fruit produced in Jeju Island. *Journal of Applied Biological Chemistry* 60:161-171
- Ko SB, Hyun CS, Kang KW (2011) A Study on Setting the Direction of Development for the Functional and Mixed Drinks using the Jeju Water. *Journal of the Korea Academia-Industrial* 12:2133-2141
- Koh G, Lee DH, Lee SA, Kang EK, Hwang O, Han HJ, Kim SY, Yang EJ, Kim MK, Chin HJ (2013) Effect of Jeju Water on Blood Glucose Levels in Diabetic Patients: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
- Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS, Kim JH (2003) Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life sciences* 73:167-179
- Lee SH, Jin KS, Son YR, Kwon HJ, Kim BW (2018) Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of *Desmodium heterocarpon* Extract in RAW 264.7 Cells. *Journal of Life Science* 28:216-222
- Lee YH, Ho JN, Dong MS, Park CH, Kim HK, Hong B, Shin DH, Cho HY (2005) Transfected HepG2 cells for evaluation of catechin effects on alcohol-induced CYP2E1 cytotoxicity. *Journal of microbiology and biotechnology* 15:1310-1316
- Lee YS, Joo EY, Kim NW (2006) Polyphenol Contents and Physiological Activity of the *Lespedeza bicolor* Extract. *Korean Journal of Food Preservation* 13:616-622
- Lim H, Kim I, Jeong Y (2019) Antioxidant activities of *Peucedanum japonicum Thunberg* root extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48:32-39
- Lyu SY, Kim JY, Noh BN, Park WB (2006) Antioxidative Activity of Water Extract of Different Parts of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *Yakhak Hoeji*, 50:191-198.
- Ma GJ, Kim SJ, Park DB (2017) Effect of Supplementation of Jeju Magma Seawater on Glucose Transport in Cultured L6 Skeletal Muscle Cells. *Journal of Medicine and Life Science* 14:23-28

- Oh HJ, Jeon SB, Kang HY, Yang YJ, Kim SC, Lim SB (2011) Chemical composition and antioxidative activity of kiwifruit in different cultivars and maturity. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 40:343-349
- World Health Organization (2010) Hardness in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. World Health Organization
- Park YJ, Han SY, Lee JJ (2022) Comparison of the Nutrition Composition and Antioxidant Activity of Carrots and Parsnips. *Korean J Community Living Sci* 33:83-99
- Shon MS, Moon HH, Han CH, Choi HJ, Han BK (2018) Hangover Relieving through Algae and Plant Complex Extract using Lava Sea Water. *Food Engineering Progress*. 12:2133-2141
- Soobrattee MA, Neergheen V, Luximon-Ramma A, Aruoma O, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular mechanisms of mutagenesis* 579:200-213
- Sun Y, Li M, Mitra S, Hafiz Muhammad R, Debnath B, Lu X, Jian H, Qiu D (2018) Comparative phytochemical profiles and antioxidant enzyme activity analyses of the southern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) at different developmental stages. *Molecules* 23:2209
- Wong SP, Leong LP, Koh JHW (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry* 99: 775-783