

주정농도에 따른 다시마 추출물의 생리활성 평가

김진^{1,5}, 이창문^{2,3}, 김춘성^{4,5*}, 이숙영⁵

¹조선대학교 구강악안면외과학교실, ²전남대학교 헬스케어메디컬공학부, ³헬스케어공학연구소,

⁴조선대학교 치과대학 구강생화학교실, ⁵조선대학교 해양헬스케어유효성실증센터

Physicochemical Activity of *Laminaria japonica* of According to Extraction Solvent Concentration

Jin Kim^{1,5}, Chang-Moon Lee^{2,3}, Chun Sung Kim^{4,5*}, Sook Young Lee⁵

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Chosun University

²School of Healthcare and Biomedical Engineering, Chonnam National University

³Research Center of Healthcare and Biomedical Engineering, Chonnam National University

⁴Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

⁵Marine Healthcare Research & Evaluation Center, Chosun University

요약 본 연구에서는 에탄올 농도를 달리하여 추출한 *Laminaria japonica*의 항산화 및 항염증 활성을 측정하였다. 0 % (0%E), 30 % (30%E), 50 % (50%E), 70 % (70%E) 및 90 % (90%E) 조성 에탄올에 *Laminaria japonica*을 각각 첨가하여 추출물을 얻었다. GC-MS 분석 결과 *Laminaria japonica*의 추출물에서 파이토케미컬 성분을 확인하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)를 적용한 항산화 활성은 50%E 조건의 추출물에서 가장 높은 소거 활성을 확인하였다. Nitric oxide (NO) 저해측정은 Lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW 264.7 세포에서 70%E 추출물이 1 mg/mL 농도에서 59.6 ± 2.67 %로 가장 높은 NO 저해를 나타냈다. 또한, *Laminaria japonica* 추출물은 섬유아세포의 세포이동을 촉진시켰다. 본 연구 결과, 50%E 및 70%E 조건에서 추출한 *Laminaria japonica*의 유효성분은 식품, 의약품 및 화장품의 잠재적인 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract This study evaluates the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Laminaria japonica* extracted using different ethanol concentrations: 0% (0%E), 30% (30%E), 50% (50%E), 70% (70%E), and 90% (90%E) ethanol were added to fresh *Laminaria japonica*. The GC-MS analysis revealed the presence of phytochemical components in the ethanolic extract of *Laminaria japonica*. The antioxidant activity of 50% ethanol extract was highest in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assays. The anti-inflammatory effects of *Laminaria japonica* extracted with different ethanol concentrations were examined using the nitric oxide (NO) inhibition assay. In lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells, 70% ethanol extract showed the highest inhibition of NO production (59.6 ± 2.67 %) at 1 mg/mL concentration. In addition, the extract of *Laminaria japonica* was observed to enhance the cell migration of fibroblast cells. The results of this study indicate that *Laminaria japonica* extract can be used as a potential functional material for foods, pharmaceuticals, and cosmetics when extracted with 50%E and 70%E ethanol.

Keywords : *Laminaria japonica*, Antioxidant, Anti-inflammatory, Phytochemical, Extract

이 논문은 2021년도 해양수산부 재원으로 해양수산과학 기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구 사업입니다. (20210656, 빅데이터 기반 해양바이오스 제어 및 마린바이오텍스 개발사업), 이 논문은 2022년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (No. NRF-2022R1A2C1011783)

*Corresponding Author : Chun Sung Kim(Chosun Univ.)

email: cskim2@chosun.ac.kr, seedbank@chosun.ac.kr

Received October 27, 2022

Revised December 5, 2022

Accepted December 7, 2022

Published December 31, 2022

1. 서론

최근 국내 소재·부품·장비에 대한 산업적 경쟁력 강화로 국내 자체 기술을 이용한 미래적인 자립적 가치가 중요해졌다. 특히 국내 해양바이오 소재 시장규모는 6,405 억원으로 해양소재의 활용이 다각화되면서 해양 바이오 소재에 대한 관심이 큰 폭으로 증가되고 있다[1]. 우리나라의 해조류는 주로 김, 미역, 다시마, 툇 및 우무 등이 식용으로 이용되고 있다. 가공형태로는 건제품, 염장품 및 조미품 등으로 제조된다. 해조류의 영양성분은 열량이 낮고 식이섬유, 비타민, 무기질, 미네랄 등이 풍부하여 유용 식용자원중의 하나이다[2,3]. 국내 식품의약품안전청(FDA)에는 의약품 및 화장품에 사용 가능한 해조류는 갈조엑스(Algae extract)로 등록되어 있다. 갈조엑스에 속하는 다시마와 미역의 약리적 효능이 입증되면서 갈조 성분의 이용적 가치가 향상되고 있다.

특히, 다시마(*Laminaria japonica*)는 갈조 식물군에 속하며, 동의보감에 서는 '곤포'라 하여 노폐물의 배설을 촉진하며, 고혈압, 동맥경화, 갑상선종, 신장염에 효과와 암세포의 증식을 억제하고, 노화를 예방하는 건강장수식품으로 기록되어 있다[3]. 또한, 신체 생리대사에 관여하는 무기질(Na, K, Ca, Mg, P, S 등)과 fucoidan, laminaran, alginic acid 등 다당류 및 폴리페놀류와 같은 생리활성 물질을 함유하고 있다[4]. 갈조류의 폴리페놀에 항산화능력은 혈압강하, 콜레스테롤 저하, 간 보호, 항바이러스 및 항박테리아, 항암, 항염증 효과 등 해조류의 다양한 생리활성에 기여한다고 보고했다[5]. 갈조류 소재 연구는 육지 식물보다 채취, 분류, 보관 및 염의 제거와 같은 추출 방법 등이 복잡하고 외부적인 환경에 매우 불안정하다. 또한, 기존의 갈조류추출에서 열처리 추출법은 영양소의 파괴 및 생리활성물질의 손실 등의 문제점들이 발생되어 추출 및 가공방법이 제한적으로 사용되고 있다[6,7].

해조류를 식품, 의약품, 화장품에 적용하기 위해 다양한 추출방법과 생리활성 물질에 대한 유효성분 연구가 필요로 한다. 생리활성물질은 항산화와 합염증 작용에 영향을 준다[8].

활성산소가 체내 필수 물질과 반응하기 전에 먼저 반응하여 세포의 산화를 억제하는 물질을 항산화제라고 한다. 신체 내에 널리 분포되어 있는 대식세포는 외부 병원체가 침입했을 경우 면역, 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포는 지질다당체(lipopolysaccharide)의 자극에 반응하여 아주

효과적으로 염증인자들이 생성되기 때문에 유용한 항염증 물질을 찾는 선별 검사에서 사용되고 있다. 일반적으로 천연 추출물은 추출 부위, 방법, 조건 및 추출용매 등에 따라 유효 물질의 함량 및 패턴이 다르며, 항산화 활성, 지질대사 등 이화학적 특성에 변화를 준다[9]. 추출용매의 선별은 기능성 물질을 추출 할 때 매우 중요하게 작용할 수 있으며 항산화성 물질을 추출할 때도 활용된다[10]. 국내에서 쉽게 채취할 수 있는 다시마를 주정 농도에 따른 이화학적 연구는 매우 미비하다.

따라서, 본 연구에서는 다시마의 이용가치를 높이기 위하여 주정농도에 따라 추출한 시료를 GC-MS를 이용한 성분 분석과 in vitro 항산화 및 항염활성 검증을 통해 해조류의 식품, 의약품, 화장품 산업에 적용 가능성을 확인하고 해양 바이오분야에 기초자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료 및 재료

본 실험에 사용한 다시마(*Laminaria japonica*)는 전라남도 완도 신지면 월부리 인근해에서 채취하여 사용하였다. 주정(pretanol A, 95%)은 덕산종합과학 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoleum (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), Lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin는 Gibco (Rockville, MD, USA)제품을 사용하였다.

2.2 다시마 중금속 저감처리

채취한 다시마 원물 1 kg을 30분 동안 흐르는 물에 세척 후, 갈조 식물에 함유된 중금속을 제거하기 위해 온가압추출장치 (DF-100A, DURI Scientific Inc., Korea)를 이용하여 121 °C에서 15분간 처리하였다. 처리 후 원물은 2차 세척 후 자연 건조시킨 후 실험에 사용하였다. 중금속 분석은 건조된 다시마 약 0.1 g을 10 mL 산분해용 가압용기에 넣고 혼합산(HNO₃:HClO₄=3:1) 8 mL를 첨가한 후 실온에서 4시간 이상 반응시켰다. 산분

해용 가압 용기의 뚜껑을 닫아 밀폐시킨 후 100 ± 5 °C로 6시간 이상 가열하여 완전히 분해하였다. 이후 산을 완전히 증발시킨 다음 1N HNO₃ 용액으로 희석하여 추출 및 분석하였다. 총 3종의 중금속을 분석하였으며, Cd, Pb, As의 농도는 유도결합 플라즈마 질량분석기 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, NexION 300D, PerkinElmer Inc., USA)를 이용하여 정량하였다.

2.3 시료 제조

분쇄한 다시마 분말에 농도별(0, 30, 50, 70, 90 %) 주정 원료를 용매로 하여 추출물을 제조하였다. 주정 0 % (증류수 100 %)는 분말 10 g에 증류수 100 mL를 첨가 (1:10, w/v)하여 100 °C에서 3시간 동안 교반 추출한 후 원심분리기 (UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 2,090 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다.

얻어진 잔사는 이와 동일한 방법으로 2회 반복하여 추출하였다. 3회 추출하여 얻어진 상층액을 필터페이퍼 (Advantec 5A, ToyoRoshi Kaisha, Japan)로 분리 정제하여 얻어진 추출물을 농축과정 없이 동결건조 (Ilshin BioBase co. Ltd., Korea)하였다. 위와 같은 방법으로 주정 농도 30 %, 50 %, 70 %, 90 % 용액에 다시마 분말 10 g에 농도별 주정 100 mL를 첨가(1:10, w/v)하여 3회 추출하여 얻은 추출액을 55 °C water bath에서 rotary evaporator (Rotary vacuum evaporator N-N series, EYELA, Japan)로 감압하여 농축한 추출물은 진공건조 (vacuum drying oven, Vision, Daejeon, Korea)한 후 분말화하여 -70°C 초저온 냉동고 (DF9010, Ilshin Bio base Co., Ltd., Dongducheon, Korea)에 보관하면서 시료로 사용하였다.

추출물의 주정 농도별 수율을 확인하기 위해 보관 용기 무게와 건조 후 시료 무게 차이로 수율을 확인하였다.

2.4 추출물의 흡광도 측정

UV-Vis spectrophotometer (UV-1900, Shimadzu, Japan)로 가시영역 전범위(400~700 nm)의 흡수 파장에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다. 동결건조된 시료는 10 mg/mL의 농도로 각 추출용매에 용해시켰다.

2.5 추출물의 성분 분석(GC-MS)

각 추출물 성분 분석을 위해 GC-MS(Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-2010; Shimadzu Co.,

Japan)를 이용하였으며 DMSO에 충분히 용해한 후, 원심분리기를 이용하여 부유물을 제거하고 마이크로 필터 (0.45 μm)로 여과하여 시료를 준비하였다. 컬럼은 BD-5(60 mm×0.25 mm×0.25 mm), carrier gas는 He으로 flow rate 1 mL/min, injection 온도는 250 °C, split ratio 10:1, oven 온도는 50-300 °C/3 °C 승온, injection volume은 1 μL 조건으로 성분분석을 하였으며, mass selective detector(MSD)에서 mass range 28-550, acquisition mode는 scan mode 조건으로 성분들을 정량하였다.

2.6 DPPH 라디칼 저해능 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activity는 Blois의 방법에 준하여 항산화력을 측정하였다[11]. 각 추출물은 1, 5, 10 mg/mL의 농도가 되도록 70 % ethanol로 희석하여 사용하였다. DPPH는 95 % ethanol에 희석하여 517 nm 흡광도로 측정하였다. 추출물 용액 0.20 mL와 DPPH 용액 1.80 mL를 test tube에 주입 후 혼합하여 30분간 반응시켰다. 반응물은 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical scavenging activity는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 백분율로 표시하였다.

2.7 ABTS 라디칼 저해능 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS) radical scavenging activity는 Re 등의 방법을 수정 하여 항산화력을 측정하였다[12]. 각 추출물은 1, 5, 10 mg/mL의 농도로 70% ethanol로 희석하여 사용하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온 암소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.700 ± 0.01 이 되도록 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 추출물 용액 0.2 mL와 ABTS 용액 1.8 mL를 test tube에 주입 후 혼합하여 30분간 반응시켰다. 반응물은 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. ABTS radical scavenging activity는 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도를 구하여 백분율로 표시하였다.

2.8 추출물의 세포독성

Raw264.7 cell을 5.0×10^4 cells/well씩 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO² incubator에서 24시간 동안 배양 후 각 추출물을 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 MTT용액을 처리를 통해 세포독성을 산출하였다. MTT 용액(5 mg/mL)을 10 μ l씩 각각 well에 첨가하고 2시간 동안 배양한 후 배양 상등액을 제거하고 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.9 항염 평가

Raw 264.7 cell을 3.0×10^5 cells/well씩 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO² incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 다시마와 추출 시료 0.1, 0.5, 1 mg/mL을 100 μ l 와 LPS (1 μ g/ μ l)를 동시 처리하여 24시간 배양하고, 세포 배양 상등액 100 μ l와 Griess 시약 100 μ l 혼합하여 10분간 실온암소에서 반응시킨 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약 (1 % (w/v) sulfanil amide, 0.1 % (w/v) naphylethylene diamine in 2.5 % (v/v)phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO²⁻의 형태로 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 serial dilution하여 얻었다.

2.10 세포이동성 평가

세포단층 (cell monolayer)에 scratch를 가하면 주변의 세포들은 세포 증식과 이동을 통해 손상된 부위를 복구 하게 된다. 즉 세포이동은 세포증식과 함께 창상치유 과정에서 큰 의미를 갖는다[11]. HaCaT 세포를 48 well plate에 5×10^4 cell/well의 농도로 분주하여 37 °C, 5% CO² incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 단층이 형성되면 200 pipet tip으로 scratch를 가해 빈 공간을 만들고, 혈청을 포함하지 않은 배지를 처리하고 다시마 추출물을 1 mg/mL 농도를 100 μ l씩 처리한 후, 24시간 배양하였다. 세포 이동능을 정량하기 위해, 추출물 처리 후, 0 h 과 16 h의 세포 사진을 Olympus inverted microscope를 이용하여 획득하였다. 각 샘플의 세포이동능은 Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 이용하여 이동된 거리의 양을 %로 정량하였다.

2.11 통계처리

모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 대조군과 실험군사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test로 수행하였으며 p 값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 판단하였다.

3. 결론 및 고찰

3.1 다시마의 중금속 저감효과

본 연구에서 사용된 다시마에서 검출된 납, 비소, 카드뮴의 농도는 Table 1 과 같다. 고온 가압공정은 다시마의 중금속 저감에 효과를 나타냈다. 고온가압공정 전에는 다시마에서 납 0.05 mg/kg, 비소 3.24 mg/kg, 카드뮴 0.05 mg/kg 이 검출되었으나, 고온가압공정 후 납 0 mg/kg, 비소 0.04 mg/kg, 카드뮴 0 mg/kg 으로 줄어들었다.

다시마등의 갈조류 세포벽은 점성 다당류인 셀룰로오스, 푸코이단, 알긴산 및 알긴산염으로 이루어져 있다. 이들 구성 당 중에는 카르복실기나 황산기를 지닌 당 성분이 함유되어 있어 해수 중에 이온을 선택적으로 흡수 또는 교환한다[12]. 따라서 이러한 해조류 중금속의 생물농축도 차이는 세포벽 다당류의 양 및 조성차이에 의한 것으로 보고되고 있다[13].

Table 1. Concentration of heavy metals in the processed *Laminaria japonica* collected from auto calve

Species		Heavy metal concentrations (mg/kg, dry weight)		
		Pb	As	Cd
<i>Laminaria japonica</i>	Before	0.05	3.24	0.05
	After	0	0.04	0.00

3.2 추출물 수율

다시마 추출 과정은 세척, 건조, 분쇄, 체질, 추출, 여과, 농축과정으로 이뤄진다. 건조된 다시마의 3회 추출 후 수율을 확인하였다. 증류수 추출은 7.32%로 가장 높았으며 50%E 조건에서 6.56 % 수율을 확인하였다 (Table 2). 주정 함유량이 높을수록 짙은 연녹색의 색상을 육안적으로 관찰하였다.

Table 2. The yields of extract manufactured by different extraction solution

Species		0	30	50	70	90
		%E	%E	%E	%E	%E
		Yield (%)				
<i>Laminaria japonica</i>	1c'	2.53	1.56	4.89	3.99	1.05
	3c'	7.32	3.54	6.56	4.65	3.26

c':cycle

3.3 추출물의 흡광도

갈조류는 광합성 엽록소 클로로필(Chlorophyll)과 갈색소로 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 함유하여 갈색을 나타낸다[14].

각 용매에 따른 시료의 추출색소의 가시광선 스펙트라를 Fig. 1에 나타냈다. 갈색소는 가시부의 400 nm에서 최대 흡수를 나타내었고 주정의 함유량이 높을수록 지용성 성질의 클로로필은 400 nm와 460 nm에 황색영역과 670 nm에서 녹색의 특정 피크가 관찰되었다. 최대 흡수파장인 400 nm부근에서의 0% E는 0.269, 90 %E에서 0.5640 흡광도 값을 보였다.

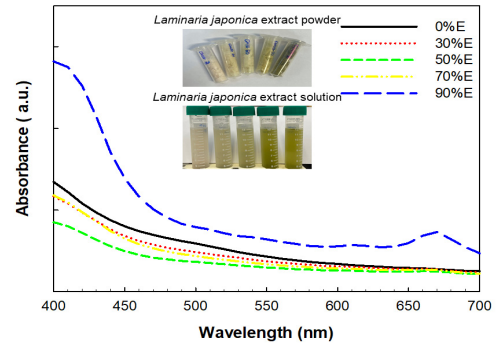


Fig. 1. UV-VIS spectra of extract from *Laminaria japonica*.

천연물의 클로로필과 플라보노이드 같은 색소 성분은 식물이 가지고 있는 고유의 물질이며 추출 조건에 따라 흡광도가 달라지는 것을 확인하였다. 주정의 농도가 높아질수록 가시광선 스펙트라의 흡광도가 높아지는 것을 관찰하였다.

극성이 높은 증류수와 저농도의 주정 용액에서 추출한 시료가 낮은 흡광도 값을 관찰하였다. 이는 추출된 성분의 분자 내에 극성기가 존재하지 않을수록 소수성 성질을 나타낸다[15].

Table 3. Compounds isolated from *Laminaria japonica* extract

RT	Compound name	0 %E	30 %E	50 %E	70 %E	90 %E
		Area (%)				
27.8	Ethanol		15.34	13.66		
28.4	Silane	9.99			16.05	3.52
38.4	Dimethyl-tricyclo					
39.7	Tetradecanoic acid					3.46
42.4	Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol					2.62
43.8	n-Heptadecanol-1					2.35
46.4	l-(+)-Ascorbic acid			7.86		
46.5	Pentadecanoic acid		4.72			18.47
51.0	Phytol					4
51.6	Octadecadienoic acid					3.69
51.8	cis-Vaccenic acid omega-7 fatty acid					14.75
56.5	Eicosapentaenoic acid					6.22
62.0	Palmitic acid	5.76	4.29	3.83	14	3.61
66.5	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	3.59			2.14	2.42
68.5	Erucic acid	80.66	75.65	74.65	71.72	25.53
77.6	Stigmasta					1.13
79.6	Fucosterol					8.23

3.4 추출물의 GC-MS성분 분석

다시마의 0 %E, 30 %E, 50 %E, 70 %E, 90 %E의 추출물에서 17종의 화합물이 검출된 것을 확인하였다. 주정 함유량에 따라 이화학적 성분 차이가 확인되었다. 특히, 90 %E 조건에서 나온 화합물의 대부분은 14종의 불포화지방산이 검출되었다. Phytol, Octadecadienoic acid, cis-Vaccenic acid, omega-7 fatty acid, Eicosapentaenoic acid 등 생리학적 기능을 가진 화합물로 추출조건에 따라 다양한 화합물의 검출을 확인할 수 있었다(Table 3).

50 %E 시료에서 L-(+)-Ascorbic acid 성분이 7.86 %가 확인되었다. 해조류에 함유된 지방산의 영양적 가치가 알려지면서 완도산 갈조류에서 불포화지방산 조성이 가장 많이 함유되어 있다고 보고하였다[16,17].

3.5 DPPH라디칼 소거능 측정

DPPH는 유기용매 또는 수용성의 추출물 항산화 활성 측정법으로 널리 이용되고 있다. DPPH radical scavenging activity는 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 아민류 및 방향족 화합물에 의해 환원되어 보라색의 탈색 정도를 지표로 하는 항산화능 측정 방법이다. 보라색을 띠는 DPPH radical 시약이 항산화 작용을 통해 radical이 소거되어 노란색으로 환원되는 원리를 이용하여 측정하였다. 다시마 추출물의 DPPH radical scavenging activity을 측정된 결과 Fig. 2 와 같다. 추출물의 농도와 radical scavenging activity가 비례한 결과를 보였다.

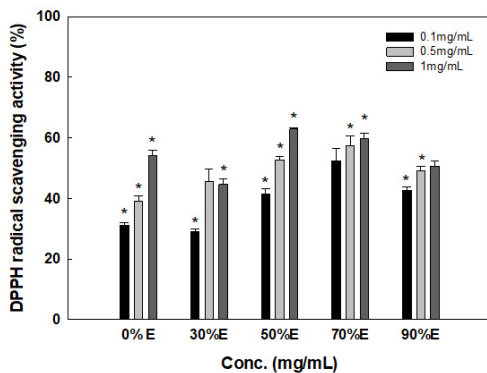


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of *Laminaria japonica* extract. *P < 0.05 compared with blank group.

다시마 추출물 50 %E로 추출한 군에서 0.1 mg/mL에서 41.4 ± 0.174 %, 0.5 mg/mL에서 52.78 ± 1.01 %, 1 mg/mL에서 62.89 ± 0.48 %로 가장 높은 radical scavenging activity를 보였다. Kang 등의 연구에서도 주정 농도에 따른 감국추출물에 경우 0 %E보다 주정농도가 높을수록 DPPH라디칼 소거능이 향상되는 경향을 관찰하였다[18].

3.6 ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS는 비교적 안정한 상태의 free radical로, DPPH보다 여러 가지 방법을 통한 radical scavenging activity을 측정할 수 있어, 다양한 시료에 이용할 수 있다. ABTS radical scavenging activity은 청록색의 ABTS radical이 항산화 물질을 포함하고 있는 추출물과 반응해 연한 녹색으로 변하는 원리를 적용한 측정 방법이다 [19]. ABTS radical scavenging activity 경우 소수성 물질과 친수성 물질의 antioxidative activity 측정이 가능하므로 일반적으로 DPPH radical scavenging activity 보다 폭 넓은 물질에 대해 활성을 나타낸다[10]. 다시마 추출물의 ABTS radical scavenging activity을 측정된 결과, 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS radical scavenging activity 또한 증가하는 것을 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 3와 같다.

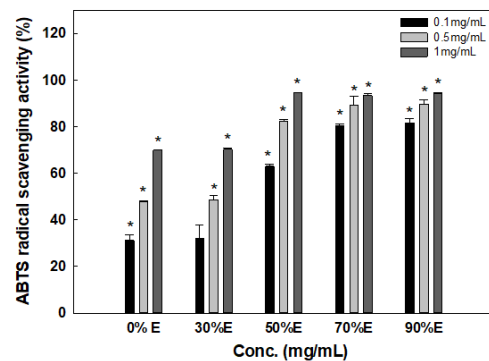


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of *Laminaria japonica* extract. *P < 0.05 compared with blank group.

다시마추출물 50 %E과 90 %E 시료군은 0.1 mg/mL에서 80.02 ± 0.85 %와 81.53 ± 1.88 %로 비슷한 수준의 소거능을 관찰하였다.

1 mg/mL에서도 94.45 ± 0.27 %과 94.19 ± 0.32 %의 radical scavenging activity를 보였다. Fu 등은

갈조식물 모자반 추출물의 에탄올 농도가 높아지면서 ABTS 라디칼 소거 활성이 높아지는 것을 보고하였다. 에탄올 농도가 50% 이상부터는 유사한 활성을 나타낸 연구결과를 발표하였다[20].

3.7 세포독성 평가

주정 농도별 다시마 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT방법을 이용하였다. 그 결과, 모든 처리군에서 세포 생존률이 모든 처리군에서 90 %이상으로 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 4). 다시마의 주정 농도에 따른 추출물의 유효물질의 안전성을 확인하였다.

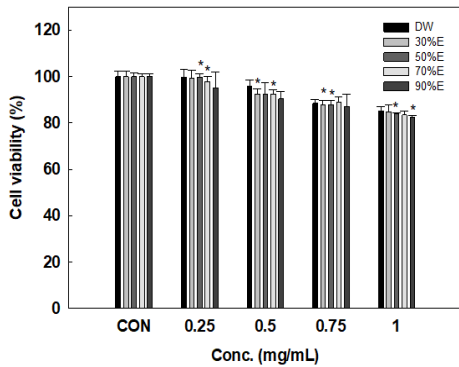


Fig. 4. Effect of *Laminaria japonica*, extracted by different ethanol concentrations on RAW264.7 cells viability. *P < 0.05 compared with control group.

3.8 항염 활성

그람음성 박테리아의 세포벽에서 추출되는 LPS로 자극된 RAW 264.7 Cell에서 발현이 되는 NO는 바이러스, 박테리아, 진균 등 다양한 병원체에 대한 방어 반응을 위한 중요한 분자이다. NO 생성을 억제하는 것은 다양한 항염증제를 선별할 수 있는 방법 중 하나이다. 다시마 추출물의 NO radical scavenging activity를 측정한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 각 추출물의 1 mg/mL 농도에서 0 %E 21.2 ± 0.32 %, 30 %E 15.2 ± 4.52 %, 50 %E 38.9 ± 2.37 %, 70%E 59.6 ± 2.67 %, 및 90 %E 48.4 ± 1.45 %의 감소율을 확인하였다.

해조류 관련 연구에서 갈조류에 속하는 감태 (*Ecklonia cava*)와 16종의 해조류에서 NO radical scavenging activity 결과 50 %가 넘는 종에서 70 % 이상의 활성이 보고되었다[21].

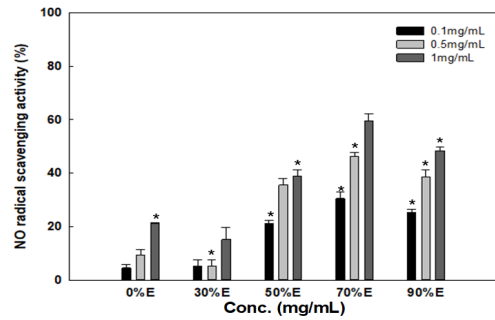


Fig. 5. Effect of *Laminaria japonica* extracted by different ethanol concentrations on LPS-induced nitric oxide production in RAW264.7 cells. *P < 0.05 compared with blank group.

3.9 세포이동성 평가

HaCaT 세포를 이용하여 세포이동성 시험(Cell migration assay)을 통해 해조류 추출물 0.1 % 처리한 군에서 처리하지 않은 군보다 빠른 이동과 증식이 확인되어 양단간의 간격이 좁아졌다.

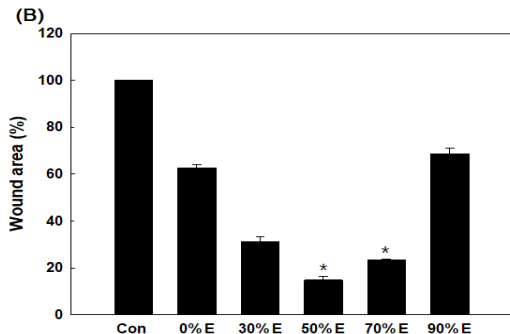
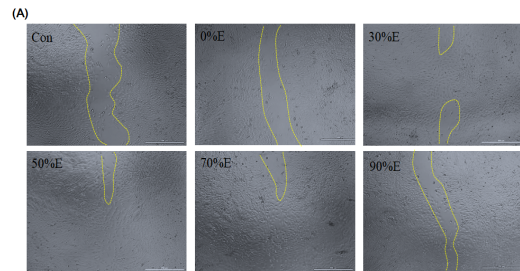


Fig. 6. Reduction by *Laminaria japonica* extract of HaCaT cells migration. (A) Representative images of wound healing assay. (B) Percentage of migration area of HaCaT cells treated with *Laminaria japonica* extract for 12 h. *p < 0.05, versus control.

다시마 추출물을 처리한 24시간 이 후부터 간격이 서서히 좁아지는 것을 확인하였다. 대조군에 비해 간격이 많이 좁아진 양상이 확인되었다(Fig. 6). 다시마에서 추출되는 생리활성 물질은 세포이동에 작용을 확인하였다.

해조류 추출물에는 다양한 생리활성 물질이 존재하며, 특히 Vitamin C와 같은 성분은 세포손상을 억제하고 및 노화 억제에 도움을 준다고 보고하였다[22,23].

4. 결론

본 연구에서는 갈조류에 속하는 다시마의 이용 가치를 넓히고자 주정 농도에 따른 추출물을 제조하였다. 다시마 0 %E, 30 %E, 50 %E, 70 %E, 및 90 %E의 추출물 시료를 GC/MS로 성분분석을 측정한 결과 총 17종의 다양한 화합물을 확인하였다. DPPH와 ABTS로 항산화측정결과 50 %E 시료에서 농도 의존적으로 항산화활성이 향상된 것을 확인하였다. 특히, ABTS 라디칼 저해측정결과 50 %E와 70 %E에서 높은 항산화능을 확인하였다. 세포안정성 평가에서도 모든 시료에서 80 %가 넘는 안전성을 나타냈다. 항염활성 측정결과 70 %E에서 NO 라디칼의 높은 저해능을 확인하였다. 세포이동성 또한 다시마 추출물내에 함유된 생리활성을 가지는 불포화지방산 및 비타민계 성분이 세포에 영향을 주는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 다시마의 주정추출물은 주정의 농도에 따라 다양한 유기화합물이 추출되며, 특히 50 %E 조건의 추출물은 식품 뿐 아니라 화장품, 의약품등에 응용 가능할 것으로 판단된다.

References

- [1] J.A. Kim, J. M. Lee, "The changes of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Hizikia fusiformis* with drying methods", *Journal of The Korean Society of Food Culture*, Vol. 19, No. 2, pp.200-208, Apr. 2004.
<http://koreascience.or.kr/article/JAKO200404637315437.page>
- [2] S. M. Ahn, Y. K. Hong, G.S. Kwon, H.Y.Sohn, "Evaluation on in-vitro anticoagulation activity of 35 different seaweed extracts", *Journal of Life Science*, Vol. 20, No. 11, pp. 1640-1647, Nov. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2010.20.11.1640>
- [3] J. Hur, Dong-ui-bo-gam. Seoul: Bupin Publishing Co. pp. 5-10, 1999.
- [4] K .Nada, V. Luciana, M. Nada, V. Stocchi, "Evaluation of marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and kombu (*Laminaria digitata japonica*) as food supplements", *Food Technology and Biotechnology*, Vol.42, No.1, pp. 57-61, Mar. 2004.
<https://hrcak.srce.hr/110723>
- [5] B.M. Kim, J.Y. Jun, Y. B. Park, I.H. Jeong. "Antioxidative activity of methanolic extracts from seaweeds", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. Vol. 35, No. 8, pp.1097-1101. Oct. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2006.35.8.1097>
- [6] J.Koo, K. Jo, J.Do, S.Woo, "Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea", *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 28, No. 2, pp. 227-236, Apl.1995.
- [7] K. Bojakowski, P. Avramczyk, M. Bojakowaska, A. Zwolinska, J. Przybyski, Z.Gaciong, "Fucoidan improves the renal bloodflow in the early stage of renalischemia/reperfusion injury in the rat", *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol.52, No.1, pp. 137-143, Apr. 2001.
- [8] Y.L. Lin, J.K.Lin, "(-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB", *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 52, No.3, pp. 465-472, Sep.1997.
DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.52.3.465>
- [9] T. S. Koh, J. T. Im, I. K. Park, H. J. Lee, D. Y. Choi, C. J. Choi, H. G. Lee, Y. J. Choi, "Effect of dietary brown seaweed levels on the protein and energy metabolism in broiler chicks activated acute phase response", *Journal of Animal Science and Technology*, Vol.47, No. 3, pp.379-390, Jun. 2005.
DOI: <https://doi.org/10.5187/jast.2005.47.3.379>
- [10] O. B. Choi, G. S. Yoo, K. H. Park, "Antioxidants and antimicrobial effects with *Castanea crenata* leaf tea", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.31, No.4, pp.1128-1131, Dec. 1999.
<https://koreascience.kr/article/JAKO199903042100883>
- [11] M. S. Blois, "Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical", *Nature*, Vol.181, pp.1199-1200, Apr. 1958.
DOI: <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [12] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.26, No.9, pp. 1231-1237, May 1999.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- [13] P. Burtin, "Nutritional value of seaweeds", *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 2, No. 4, 498-503, Jul. 2003.

<https://www.researchgate.net/publication/228554296>

- [14] M. Choi, D. I. Yoo, Y.S. Shin, "Preparation of Lip Balm Utilizing Functionalities of Colorants Extracted from Marine Algae" *Textile Coloration and Finishing*, Vol.26, No.2, pp.124-130, Mar. 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5764/TCF.2014.26.2.124>
- [15] I. P. Kavirayyani, "The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent", *Molecules*, Vol.19, No.12. pp. 20091-20112, Dec. 2014.
DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- [16] A.A.E. Gamal, "Biological importance of marine algae", *Saudi Pharmaceutical Journal*, Vol. 18, No.1, pp. 1-25, Jan. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1016/i.isps.2009.12.001>
- [17] M.S. Ali, M. Saleem, R. Yamdagni, M.A. Ali, "Steroid and antibacterial steroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* Borgesen", *Natural Product Letters*, Vol. 16, No.6. pp. 407-413. Jan. 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10575630290034249>
- [18] H .Kang, C. H. Park, S. O. Kwon, S. G. Lee, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Chrysanthemum indicum* Linne extracts at different ethanol ratios", *Korea journal of food science and technology*, Vol. 53, No.4, pp. 416-422, Aug. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2021.53.4.416>
- [19] S. H. Lee, M. S. Lee, "The research on antioxidative effect of *Sasa quelpaertensis* extractum and assessment of cytotoxicity", *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society*, Vol.18, No.3. pp. 687-693, Jun. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.3.687>
- [20] C. W. F. Fu, C. W. Ho, W. T. L. Yong, F. Abas , T. B. Tan, C. P. Tan. "Extraction of phenolic antioxidants from four selected seaweeds obtained from Sabah". *International Food Research Journal*, Vol. 23, No.6, pp.2363-2369, Dec. 2016.
DOI: <https://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.1249v1>
- [21] S. M. Ahn, Y. K. Hong, G. S. Kwon, H. Y. Sohn, "Evaluation of Antioxidant and Nitrite Scavenging Activity of Seaweed Extracts", *Journal of Life Science*, Vol. 21, No.4, pp.576-583. Apr. 2011.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2011.21.4.576>
- [22] J. W. Kim, Y. R. Kwon, K. S. Youn, "Quality characteristics and antioxidant properties in spray-dried and freeze-dried powder prepared with powdered seaweed extracts", *Korean Society of Food Science and Technology*. Vol. 44, No.6, pp. 716-721. Dec. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.6.716>
- [23] Q. Zang, D.L.Maass, J.White, J.W.Horton, "Cardiac mitochondrial damage and loss of ROS defense after burn injury: the beneficial effect of antioxidant therapy", *Journal of Applied Physiology*. Vol. 102, No.1, pp.103-112, Jan. 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00359.2006>

김 진(Jin Kim)

[정회원]



- 2007년 2월 : 전남대학교 향장학과 (공학석사)
- 2011년 8월 : 전남대학교 신화학 소재공학과 (공학박사)
- 2011년 9월 ~ 2018년 12월 : 전남대학교 공과대학 생물고분자 및 약물전달체제 연구실 박사후연구원
- 2018년 12월 ~ 현재 : 조선대학교 임상사용성평가센터 연구교수

<관심분야>

바이오 소재 기반 물질 탐색 화장품, 의약품, 의약품제품 개발

이 창 문(Chang-Moon Lee)

[정회원]



- 2003년 2월 : 전남대학교 일반대학원
- 2006년 3월 ~ 2008년 2월 : 전북대학교 의과대학 박사후연구원
- 2008년 3월 ~ 2013년 2월 : 전북대학교 의과대학 기금교수/학술연구교수
- 2013년 3월 ~ 현재 : 전남대학교 의공학과 교수
- 2021년 3월 ~ 현재 : 전남대학교 헬스케어메디컬공학부 교수

<관심분야>

나노메디슨, 약물전달, 생체재료, 분자영상

김 춘 성(Chun Sung Kim)

[정회원]



- 1996년 2월 : 조선대학교 일반대학원 유전자학과 (이학석사)
- 2001년 2월 : 조선대학교 일반대학원 유전자학과 (이학박사)
- 2009년 4월 ~ 현재 : 조선대학교 교수
- 2018년 11월 ~ 현재 : 조선대학교 링크플러스사업단 단장

<관심분야>

항암기전, 해조류 관절염 개선

이 숙 영(Sook Young Lee)

[정회원]



- 1985년 2월 : 조선대학교 일반대학원 유전자과학과 (이학석사)
- 1992년 2월 : 조선대학교 일반대학원 유전자과학과 (이학박사)
- 2020년 4월 ~ 2022년 12월 : 조선대학교 스마트의료융합기술지원센터 센터장

- 2018년 4월 ~ 현재 : 조선대학교 해양생물연구교육센터 교수

〈관심분야〉

해조류 유효활성 검증, 해조바이오 솔트