



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학 석사 학위 논문

거대녹조류 창자파래로부터 환원당  
생산 및 향산화 활성 평가



2015년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

김동현

공 학 석 사 학 위 논 문

거대녹조류 창자파래로부터 환원당  
생산 및 항산화 활성 평가

지도교수 정 귀 태

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2015년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 동 현

김동현의 공학석사 학위논문을 인준함.



위원장   공학박사   김성구 (인)

위원     공학박사   김중균 (인)

위원     공학박사   정귀택 (인)

# 목 차

List of Figures and Table ..... III

Abstract ..... V

## Chapter I

### 열수 및 효소 가수분해를 통한 거대녹조류

### 창자과래로부터 환원당 생산

1. 서론 ..... 2

2. 재료 및 방법 ..... 5

    2.1 실험 재료 ..... 5

    2.2 회분식 열수 가수분해 ..... 5

        2.2.1 고액비의 영향 ..... 6

        2.2.2 온도의 영향 ..... 6

    2.3 효소 가수분해 ..... 6

    2.4 엄격계수 ..... 6

    2.5 분석방법 ..... 7

3. 결과 및 고찰 ..... 8

    3.1 열수 가수분해를 통한 환원당 생성 ..... 8

        3.1.1 고액비의 영향 ..... 8

        3.1.2 반응온도의 영향 ..... 11

3.2 효소 가수분해에 대한 열수처리의 영향 .....	14
3.3 엄격계수의 영향 .....	17
4. 결론 .....	18
참고문헌 .....	19

## Chapter II

### 거대녹조류 창자과래 추출물의 항산화 활성 평가

1. 서론 .....	25
2. 재료 및 방법 .....	27
2.1 실험재료 .....	27
2.2 추출 및 분획 .....	27
2.3 항산화 활성 측정 .....	27
2.3.1 DPPH radical 소거능 .....	28
2.3.2 환원력 (Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay) .....	28
2.3.3 Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 .....	29
2.3.4 아질산 소거능 .....	29
2.4 총 페놀성 화합물의 함량 .....	29
3. 결과 및 고찰 .....	31
3.1 추출 및 분획 .....	31
3.2 총 페놀성 화합물의 함량 .....	33

3.3 항산화 활성 .....	35
3.3.1 DPPH radical 소거능 .....	35
3.3.2 환원력 (FRAP assay) .....	37
3.3.3 Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 .....	39
3.3.4 아질산 소거능 .....	41
4. 결론 .....	43
참고문헌 .....	44
감사의 글 .....	47



# List of Figures and Table

## Chapter I

- Fig. 1. Effect of solid-to-liquid (S/L) ratio on hydrothermal hydrolysis of *E. intestinalis*. (A) Total reducing sugar (TRS), (B) Yield ..... 10
- Fig. 2. Effects of reaction temperature and time on hydrothermal hydrolysis of *E. intestinalis* (A) TRS, (B) Yield, (C) pH, (D) Solid residue ..... 13
- Fig. 3. Post-hydrothermal enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis* hydrolysate. (A) After 30 min hydrothermal pretreatment; (B) After 60 min hydrothermal pretreatment; EH (Enzymatic Hydrolysis); IA after EH (Increasing Amount after Enzymatic Hydrolysis) ..... 16

## Chapter II

Fig. 1. Effect of solvent on lipid extraction of <i>E. intestinalis</i> using soxhlet extractor. ....	32
Fig. 2. Effect of <i>E. intestinalis</i> extracts on the DPPH radical scavenging activity. ....	36
Fig. 3. Ferric reducing antioxidant power assay of <i>E. intestinalis</i> extracts. ....	38
Fig. 4. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of <i>E. intestinalis</i> extracts. ....	40
Fig. 5. Nitrite scavenging activity of <i>E. intestinalis</i> extracts. ..	42
Table 1. Content of total phenolic compounds in extracts A, B and C of <i>E. intestinalis</i> .....	34

Production of reducing sugar and evaluation of antioxidant activities  
from *Enteromorpha intestinalis*

Dong-Hyun Kim

*Department of Biotechnology, The Graduate School,  
Pukyong National University*

### Abstract

In chapter 1, to evaluate the efficacy of marine macro-algae *Enteromorpha intestinalis* as a potential bioenergy resource, the effects of reaction conditions (solid-to-liquid ratio, reaction temperature, and reaction time) on sugars produced by a combined process of hydrothermal and enzymatic hydrolysis were investigated. As a result of the hydrothermal hydrolysis, a 7.3 g/L (8% yield) total reducing sugar was obtained under conditions including solid-to-liquid ratio of 1:10, reaction temperature of 170°C, and reaction time of 60 min. By subsequent (post-hydrothermal) enzymatic hydrolysis of samples treated at 170°C for 30 min, a 20.1 g/L (22% yield) was achieved.

In chapter 2, to evaluate antioxidant activities of *E. intestinalis*, three solvents (hexane, chloroform and methanol) were applied to obtain extracts. The extraction yields are hexane (A) 1.11%, chloroform (B) 0.94%, and methanol (C) 8.2%. Also, the contents of total phenolic compounds of extract A, B, C are 4.03%, 8.15%, and 2.33%, respectively. In the results of antioxidant activity, extract A and B present the higher DPPH activity than that of control (BHA and ascorbic acid). The DPPH radical scavenging activity and SOD-like activity are ordered as B>C>A. However, extract C show high value in ferric reducing antioxidant power assay. In nitrite scavenging activity, extract A is relatively higher than others. However, the antioxidant activities are lower than that of controls (ascorbic acid and BHA). The antioxidant activities are presented the increasing pattern of increasing by the increasing of extract concentration.

# Chapter I

열수 및 효소 가수분해를 통한  
거대 녹조류 창자파래로부터  
환원당생산

## 1. 서론

화석 연료를 대체하고자 하는 필요성은 중요한 문제로 받아들여지고 있다. 게다가, 화석 자원을 대체 할 수 있는 새로운 자원의 발견 및 이용은 최근 생겨난 세계적으로 지속적인 쟁점으로 대두 되고 있다 [1-3]. 이에 따라 바이오매스의 산업적 이용을 위한 노력이 전 세계적으로 확산되고 있다. 바이오매스는 그 이용에 있어 당질계 (1세대)와 목질계 (2세대), 그리고 해조류 (3세대) 세 가지 세대로 분류 된다 [4-6]. 특히, 해양 바이오매스는 자연 친화적이며 경제적으로 지속가능한 자원으로 높은 잠재력을 가지므로 세계적인 주목을 받고 있으며 다른 자원들에 비해 몇 가지 이점을 가지고 있다. 해조류는 육상의 식량 자원과의 경쟁을 피할 수 있으며, 당질계나 목질계 바이오매스와 비교하였을 때 리그닌 성분이 존재 하지 않으며 셀룰로오스계 구성 성분을 포함하여 전처리 공정과 당화 공정이 비교적 간단하고 쉬운 장점을 가지고 있다 [2,3,7]. 그리고 대부분의 해조류는 육상 식물보다 성장속도가 빠르며 단위 면적당 생산성이 우수하다. 하지만 이러한 중요한 이점에도 불구하고, 조류는 아직 화학공업 산업의 원료물질로 이용 되고 있는 실정이다 [1-3]. 조류 분야에서 미세 조류는 배양 및 그것의 응용에 초점이 맞춰져 있으며, 반면에, 거대조류로부터 바이오연료나 chemical 생산에 관한 여러 연구들이 보고되었다 [1,4-6].

거대조류는 녹조류와 홍조류 갈조류로 분류되며 주로 얇은 해안의 바위 등에 부착하여 서식 한다 [8,9]. 그중 녹조류는 그 세포벽에 mannose, xylan 등으로 구성된 cellulose 와 carbohydrate의 저장 물질로 starch를 포함하고 있다. 홍조류, 갈조류와 달리 녹조류는 그 세포벽에 높은 cellulose 함량을 포함하고 있다. 게다가, 녹조류는 육상 식물에 필적하는 함량의 광합성 색소 carotene 과 xanthophylls을 함유하고 있는 것으로

보고되었다 [9-11]. 해조류 중 녹조류에 속하는 파래(*Enteromorpha* genus)는 녹조 식물문 갈파래목에 속하며, 창자파래 (*Enteromorpha intestinalis*), 가시파래 (*E. prolifera*), 잎파래 (*E. linza*), 납작파래 (*E. compressa*) 등이 이에 속하며 [9,11], 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며, 조간대 해안의 바위에 부착하여 서식하고 있다 [10,11]. 파래에는 glucose, xylose, D-glucuronic acid, 그리고 L-rhamnose 등으로 구성된 다당류들이 높은 함량으로 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며 [10], 이러한 다당류들은 바이오연료나 화학물질 생산의 원료로써 높은 잠재성을 가지고 있다.

연소, 소각, 열분해, 그리고 가스화 등의 반응을 제외하고 바이오매스를 바이오연료나 화학물질로 전환시키기 위해서는 바이오매스의 가수분해는 필수적이다 [10]. 그러므로 바이오매스의 가수분해를 통한 생물전환을 위해서는 바이오매스의 전처리 공정이 핵심적이다 [12,13]. 전처리는 바이오매스의 구조적 또는 구성성분상의 장애물을 감소시킴으로써 효소 반응을 통한 바이오매스의 다당류로부터 단당류로의 전환을 최대로 이끌어 준다. 일반적으로 이러한 전처리는 열수 가수분해, 증기 폭쇄, 산, 염기, 암모니아 섬유 폭쇄법 그리고 무기 염류등의 다양한 물리 화학적 방법들이 알려져 있으며 [13,14], 실제로 거대조류의 전처리에 관한 연구들이 수행되어 보고 되었다 [2,3,5,6,10,15-17]. 이러한 다양한 방법들 중에서, 전처리는 바이오매스의 특징, 촉매 그리고 운전 변수 등이 고려된 가장 적절한 방법이 선택되어야 한다 [5,12,13]. 또한 전처리 공정에서, 가혹한 운전 조건하에서는 과도한 분해 산물인 5-HMF, levulinic acid, formic acid, furfural 그리고 phenolic compounds등이 생성되어 세포의 성장을 저해 하기도 한다 [5,12,13]. 열수 전처리법은 비싸거나 유해한 화학물질을 사용하지 않으며, 간단하며, 안전하고, 경제적이며 그리고 환경 친화

적인 방법이다 [14].

본 연구에서는 발효 저해물질의 형성을 최소화 하고 단당 생성 효율을 증진 시키기 위해 열수 및 효소 가수분해를 결합한 방법을 통해 확인하고자 하였다. 바이오매스의 전처리 효율은 목질계 바이오매스의 전처리 평가 및 비교에 널리 사용되는 엄격 계수 (severity factor)를 전처리 반응 온도와 시간의 함수로 조사하여 비교 분석 하였다 [18,19]. 본 연구는 위와 같은 방법을 이용하여 해양 거대 조류인 창자파래(*E. intestinalis*)의 바이오에너지 생산의 원료로써 이용 가능성을 확인 하고자 하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험재료

실험에 사용한 파래 (*Enteromorpha intestinalis*)는 2010년 10월 전남 진도에서 수확한 것을 건조하여 실험에 사용 하였다. 건조된 파래는 분쇄기로 분쇄하여 표준체를 사용하여 입자의 크기가 140 mesh 이하만을 분리하여 실험에 사용하였으며, 밀봉된 상태로 실온에서 보관 하였다. 창자파래는 42.8%의 총 탄수화물, 31.6%의 조단백질, 1.3%의 조지질, 그리고 24.3%의 조회분으로 구성 되어 있었다 [8]. 효소 가수분해 반응에 사용한 효소인 Viscozyme L과 Cellic<sup>®</sup> CTec2은 Novozymes A/S(Denmark)의 제품을 사용하였으며, 모든 시약들은 분석용 등급을 사용하였다.

### 2.2 회분식 열수가수분해

회분식 열수가수분해 반응의 연구를 수행하기 위하여 다음과 같은 방법을 이용 하였다. Stainless steel reactor에 일정한 양의 바이오매스와 증류수 40 mL를 혼합하여 넣고, PID temperature controller를 통해 조절 되는 oil bath에서 반응 온도를 130, 150, 170, 190, 210℃로 설정하여 수행하였고, magnetic stirring을 통해 200 rpm로 교반을 실시하였다. 반응의 끝난 후 반응기는 수돗물을 이용해 즉각 실온으로 냉각 시켰다 [15]. 전처리 된 바이오매스 용액은 총환원당 분석과 효소 가수분해 반응에 사용하였다.

### 2.2.1 고액비의 영향

고액비가 창자과래의 열수가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고액비의 범위를 1:5, 1:7.5, 1:10, 1:12.5, 1:15, 1:20 (질량/부피) 설정하여 수행하였다. 증류수의 양은 40 mL로 고정하였고 설정된 고액비에 따라 바이오매스 조절하여 첨가하였다. 열수 가수분해는 170°C에서 30분과 60분 동안 반응을 실시하여 생성된 환원당의 양을 측정하였다.

### 2.2.2 반응온도의 영향

반응온도가 창자과래의 열수가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고액비를 1:10으로 설정한 뒤 다음과 같은 실험을 수행하였다 [5,13,20]. 열수 가수분해는 130, 150, 170, 190, 210°C에서 30, 60분 동안 반응을 실시하여 생성된 환원당의 양을 측정하였다.

## 2.3 효소 가수분해

효소 가수분해가 창자과래의 환원당 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 플라스크에 130, 150, 170, 190, 210°C에서 열수가수분해 된 바이오매스 용액과 효소복합체 (Viscozyme L: Cellic<sup>®</sup> CTec2 = 1:1, v/v)를 바이오매스 중량을 기준으로 10%를 첨가하여 교반배양기를 이용하여 45°C, 170 rpm으로 48시간 동안 효소 가수분해를 실시하였다 [21]. 효소 가수분해가 끝난 후, 반응액은 4000 rpm으로 15분간 원심분리되어 상등액을 얻었으며 총 환원당 분석에 사용되었다.

## 2.4 엄격계수

열수 전처리 능력은 엄격 계수(Severity factor, SF)를 통해 평가 되었으며, 엄격계수는 전처리 온도와 시간에 대한 함수로써 표현 되었다 [18,19]. 엄격 계수  $\log(R_0)$ 는 다음과 같이 정의 하였다.

$$R_0 = t \cdot \exp\left(\frac{T(t) - 100}{14.75}\right)$$

t는 전처리 시간 (min), T(t) 는 전처리 온도 (°C), 100은 기준 온도, 14.75는 고정된 임의상수 이다.

## 2.5 분석방법

총 환원당 양의 분석은 3,4-dinitrosalicylic acid (DNSA) 법을 변형하여 사용하였다 [22]. 적절히 희석된 시료 100  $\mu$ L, 증류수 0.9 mL 그리고 DNS reagent 3 mL를 혼합하여 항온수조에서 끓는 물에 5분간 반응 시킨 뒤에, 즉각 실온 부근으로 냉각 시킨 뒤, 분광광도계 (Spekol 1300, Analytik Jena, Germany)를 이용하여 580 nm 파장에서 흡광도를 측정 하였다. 표준물질로는 glucose를 이용하였다. 총 환원당 수율은 생성된 환원당의 농도를 초기 기질의 농도로 나누어 구하였다.

### 3. 결과 및 고찰

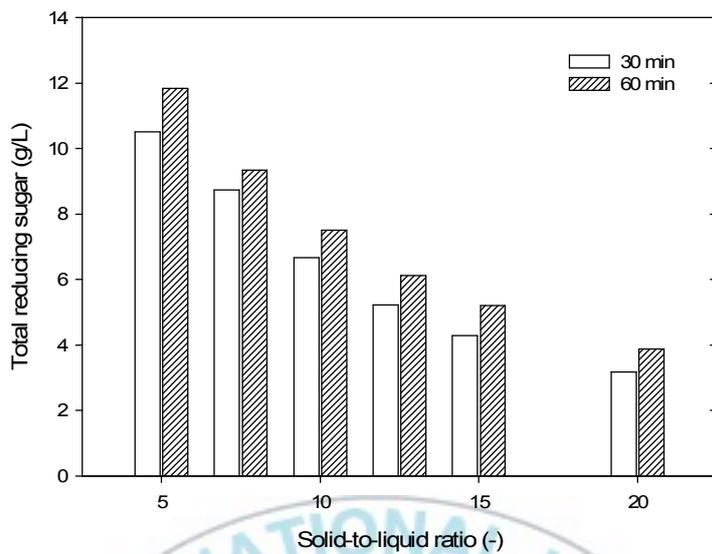
#### 3.1 열수 가수분해를 통한 환원당 생성

산 또는 알칼리 용매를 사용하지 않고 물을 이용한 열수 전처리/가수분해 반응을 120에서 200°C 사이에서 진행 하였다. 이러한 온도 범위는 바이오매스의 가수분해 반응에 유리한 조건이나 또한, 동시에 생성된 당의 분해 반응 생성물이 형성 된다. 따라서 이러한 반응에서 최대로 당을 확보하고 효소 가수분해 효율을 높이기 위해서 매우 신중하고 적절한 운전 변수들이 선택되어야 한다고 알려져 있다 [14]. 따라서 본 연구에서는 창자과래의 열수 가수분해 반응이 환원당 생산에 영향을 알아보기 위해 고액비, 반응 온도 그리고 반응 시간의 반응 변수를 설정하였다.

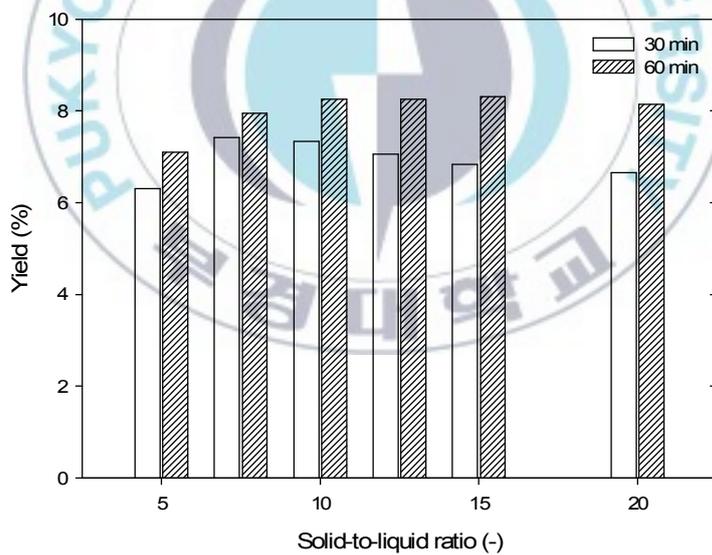
##### 3.1.1 고액비의 영향

고액비가 창자과래의 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고액비의 범위를 1:5, 1:7.5, 1:10, 1:12.5, 1:15, 1:20 (질량/부피) 설정하여 수행 하였다. Fig. 1A는 170°C에서 60분 동안 생성된 환원당의 농도를 비교해 나타낸 것이다. 고액비가 증가 할수록, 전체적인 환원당 생성 양은 감소하는 경향을 나타내었다. 30분 반응 시간과 60분 반응 시간의 전체적으로 비슷한 환원당 생성 경향을 나타냈다. 고액비가 1:5인 조건에서 60분의 반응 시간 동안 11.8 g/L 의 환원당이 생성되었다. 이와 비교하여 Fig. 1B는 각각 다른 고액비에서 생성된 환원당의 수율을 비교해 나타낸 것이다. 30분 반응 시간에서는 가장 높은 수율을 고액비 1:7.5 와 1:10에서 얻을 수 있었으며, 그러나 고액비 1:10을 넘어서면

생성된 환원당의 수율이 약간의 감소하는 경향이 나타났다. 60분의 반응 시간에서 고액비가 증가 할수록 생성된 환원당의 수율도 증가하는 경향을 나타내었지만, 고액비 1:10 이후로는 큰 변화를 나타 내지 않았다. 고액비가 1:10에서 8.26%의 환원당이 생성되었다. 하지만 낮은 고액비에서는 높은 환원당 농도가 생성 되었지만 상대적으로 낮은 환원당 생성 수율 나타내는 경향이 나타났다. 이와 비슷한 결과로, Jang 등 [20]은 다시마 (*Saccharina japonica*)의 동시당화발효에 관한 연구에서 높은 점도로 인한 슬러리의 조작에 따른 어려움의 이유로 바이오매스의 양(고액비)을 일반적으로 10% (w/v)로 제한을 했으며, Meinita 등 [5]은 *Kappaphycus alvarezii* 의 황산 및 염산 가수분해에서 최적 *Kappaphycus alvarezii*의 양을 10%로 보고 하였다. 이러한 모든 결과에 비추어 고액비 1:10을 적정 고액비로 선정하였다.



(A)



(B)

Fig. 1. Effect of solid-to-liquid (S/L) ratio on hydrothermal hydrolysis of *E. intestinalis*. (A) Total reducing sugar (TRS), (B) Yield

### 3.1.2 반응온도의 영향

반응온도가 창자과래의 열수 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고액비 1:10 그리고 반응온도 범위 130, 150, 170, 190, 210°C에서 열수가수분해된 시료의 생성된 환원당의 양, pH 변화 그리고 잔존하는 고형물의 양을 분석하였다. Fig. 2A는 각각 다른 반응온도에서 생성된 환원당의 양을 나타낸 것이다. 가장 낮은 반응온도 130°C에서는 1.57-1.72 g/L의 환원당이 생성되었다. 반응온도가 증가할수록 많은 양의 환원당이 생성되는 경향을 나타내었다. 30분의 반응 시간에서는 190°C의 반응온도에서 가장 높은 7.16 g/L의 환원당이 생성되었다. 60분의 반응 시간에서는 170°C의 반응온도에서 가장 높은 7.3 g/L의 환원당이 생성되었다. 그리고 190°C의 반응온도에서는, 30분의 반응시간에서 생성된 7.16 g/L의 환원당이 60분의 반응시간에서 4.37 g/L로 감소가 나타났다. 210°C의 반응온도에서 생성된 낮은 농도의 환원당의 결과와 함께 이것은 당의 분해(탈수)반응이 일어난 것으로 판단된다. 그러므로 환원당의 과분해반응은 장기간 높은 온도에서 반응이 지속될 경우 발생하는 것으로 판단된다. 실제로, 목질계 바이오매스와 해조류의 산 가수분해에서 위와 같은 환경에서 바이오매스의 노출은 당의 과분해로 인해 5-HMF, levulinic acid, formic acid 그리고 char 등이 생성된다는 연구 결과가 보고되었다 [4-6]. Kim [9]은 *Ulva pertusa*의 열수전처리와 마이크로파를 이용한 전처리를 통한 환원당 생산에 관한 연구에서, 열수가수분해 시 100-150°C의 반응온도 중 150°C의 반응온도에서 가장 높은 효과를 얻었다. 그러나 마이크로파를 통한 전처리에서는 마이크로파의 전력(50 W, 100 W)에 비해 전처리 온도에 대한 영향이 더 높다고 보고 하였다. 그러나 Yoon 등 [17]은 *U. pertusa*의 5% 과산화수소를 사용한 전처리에서 반응

온도 60°C에서 3시간 동안 전처리를 실시하였을 때 가장 높은 glucose 수율을 얻었다고 보고하였다. 또한 Lee 등 [2,3]에 의하면 *Pichia stipitis* 를 통한 바이오에탄올 생산하는 연구에서 100 g/L의 *U. Pertusa*를 condensation을 통해 반응온도 150°C에서 15분간의 가수분해하여 주로 glucose와 xylose로 구성된 30 g/L의 가수분해 산물을 얻었다고 보고하였다.

Fig. 2B에 각각 다른 반응 온도에 따른 과래의 열수가수분해 중 생성된 환원당의 수율을 비교하여 나타내었다. 수율은 생성된 환원당의 농도에 비례하는 경향을 나타냈다. 170°C의 반응온도에서 60분의 반응 시간에 8%의 수율을 나타냈지만 190°C의 반응온도에서 30분의 반응 시간에 7.87%의 수율을 나타냈다.

Fig. 2C에 각각 다른 온도에서 열수가수분해 후 변화된 pH를 비교하여 나타내었다. 열수가수분해 전 반응물의 pH는 5.3이었으나 열수가수분해 후 모든 조건에서 pH는 감소하는 경향을 나타냈다. 가장 낮은 pH는 190°C의 반응온도에서 4.05를 나타냈다. 이러한 낮은 pH로 인해 다른 촉매의 첨가 없이 창자과래의 가수분해가 유도되는 결과로 판단된다. 또한, 고온의 반응온도에서 환원당의 분해로 생성된 levulinic acid, formic acid 등이 반응액의 pH를 감소시키는 것으로 판단된다. 다른 한편, 210°C의 반응온도에서는 과분해 결과 생성된 5-HMF, levulinic acid 그리고 formic acid 등이 축합반응을 일으켜 생성된 부산물들로 인해 용액의 pH의 증가를 일으킨 것으로 판단된다 [23-25]. Fig. 2D에 각각 다른 온도에서 열수가수분해 후 잔존하는 고형물의 양을 비교하여 나타내었다. 잔존하는 고형물의 양은 반응온도가 감소할수록 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 30분에서 60분 동안 반응시간이 지속되는 동안 잔존하는 고형물의 양은 반응시간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다.

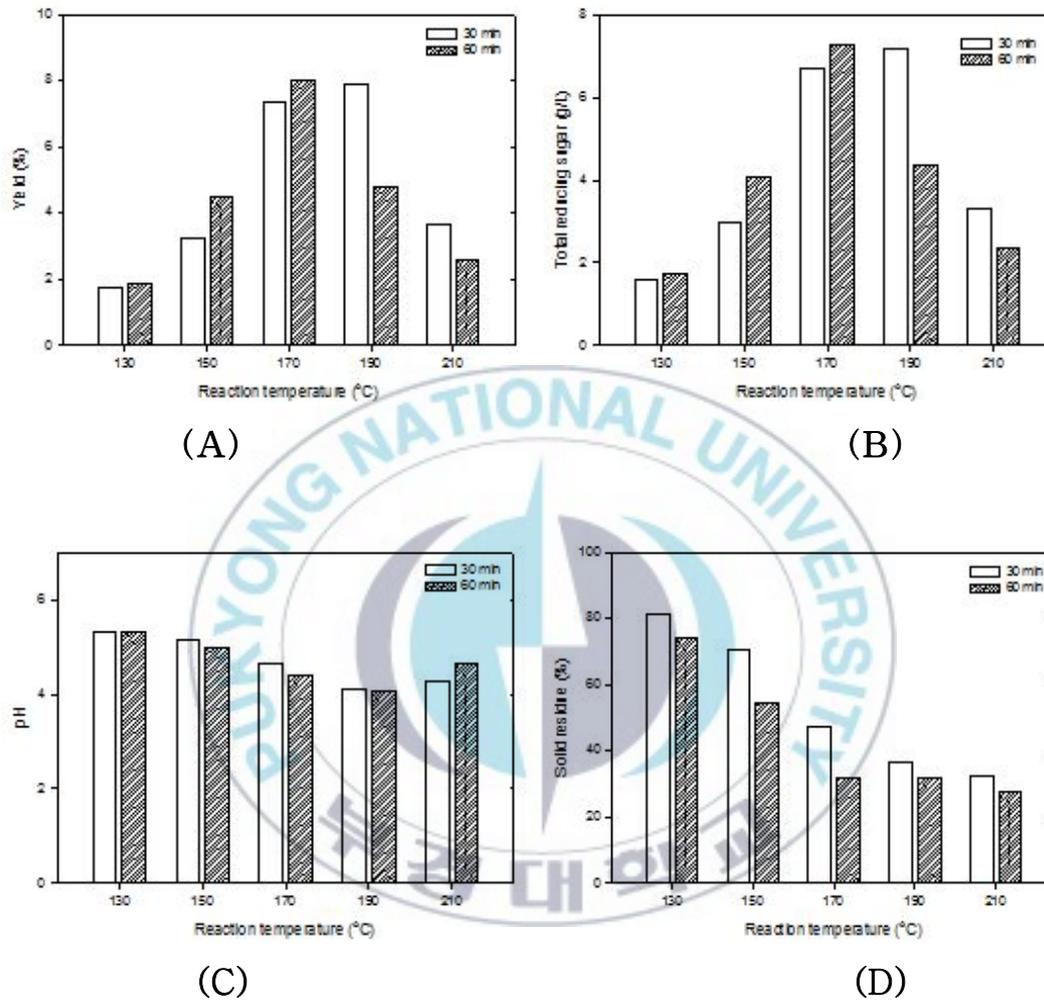
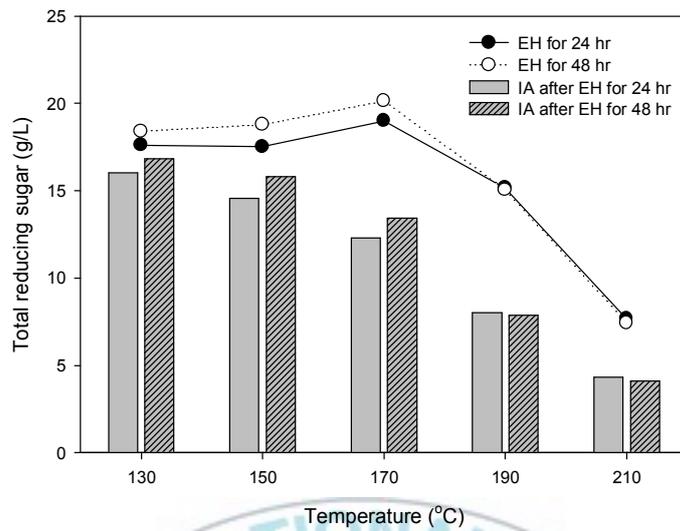


Fig. 2. Effects of reaction temperature and time on hydrothermal hydrolysis of *E. intestinalis*. (A) TRS, (B) Yield, (C) pH, (D) Solid residue

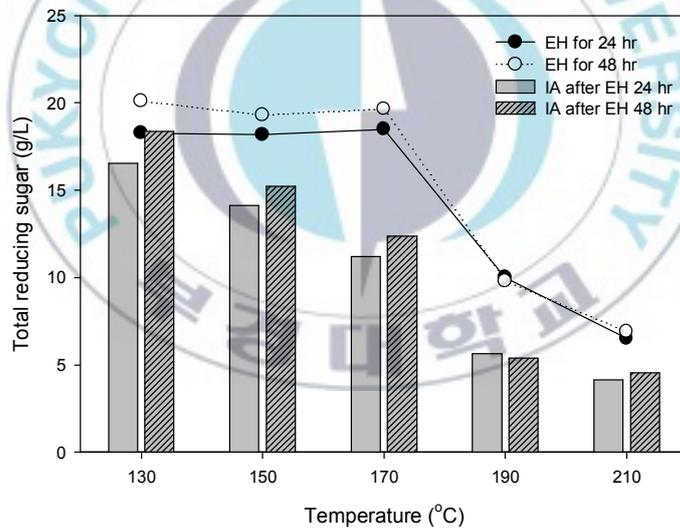
### 3.2 효소 가수분해에 대한 열수처리의 영향

효소 가수분해가 창자과래의 환원당 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 130, 150, 170, 190, 210°C의 반응온도에서 30분의 반응시간 동안 열수가수분해된 용액(Fig. 2)에 효소복합체 (Viscozyme L:Cellic<sup>®</sup> CTec2 = 1:1, v/v)를 전처리된 중량을 기준으로 10%를 첨가하여 교반배양기를 이용하여 45°C, 170 rpm으로 48시간 동안 효소 가수분해를 실시하였다(Fig. 3). 생성된 총 환원당의 양은 반응시간이 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었다. 170°C의 반응온도에서 열수가수분해된 시료는 48시간의 효소 가수분해에서 20.1 g/L의 가장 높은 환원당 양을 나타내었다. 높은 반응온도에서 열수 가수분해된 시료는 이어진 효소 가수분해에서 전체적으로 낮은 환원당 양을 나타내었다. 효소 가수분해 결과와 낮은 반응온도에서의 열수 가수분해 결과(Fig. 2A)를 비교해 보면, 분명하게 높은 환원당의 양이 효소 가수분해로 인해 생성된 결과를 나타낸다. 그것은 Fig. 2D에서 볼 수 있듯이, 낮은 반응온도에서 열수 가수분해한 경우 잔존하는 고형물의 양이 증가하므로 효소 가수분해로 인해 많은 양의 환원당이 생성된 것으로 판단된다. 다시 말해, 효소 가수분해에 의해 생성되는 환원당의 양은 선행되어진 열수 가수분해 후 잔존하는 고형물의 양에 비례하는 결과를 나타내었다. Fig. 3B은 130-210°C의 반응온도에서 60분간 열수 가수분해한 시료의 48시간 동안 효소 가수분해한 결과를 비교해 나타낸 것이다. 24 그리고 48시간의 효소 가수분해에서 낮은 온도에서 열수 가수분해된 시료는 효소가수분해 반응시간이 길수록 생성되는 환원당의 양이 증가하는 경향을 나타내었다. 130°C의 반응온도에서 60분의 반응시간 동안 열수 가수분해된 시료에서 20.1 g/L의 가장 높은 환원당이 생성되었다. 이것은 같은 조건에서 30분의 반응시간동안

열수 가수분해된 시료보다 더 높은 결과로, 낮은 반응온도의 열수 가수분해 처리 후에 잔존하는 고형물은 효소 반응에 의해 쉽게 가수분해되는 것을 나타내었다. Fig. 3A 결과에는 높은 반응온도에서 열수 가수분해가 진행될수록 효소 가수분해 수율이 낮은 경향을 보여준다. 그리고 효소 가수분해에 의해 증가된 환원당의 양을, 170-210°C의 반응온도에서 60분간 열수 가수분해 처리된 시료의 (Fig. 3B) 24, 48시간 동안 효소 가수분해에 의해 증가된 환원당의 양 비교하였을 때, 170°C의 경우에만 48시간에서 증가 한 후 이후에는 감소하거나 증가하지 않는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 효소 가수분해 역시 당의 과분해 산물인 5-HMF, levulinic acid 그리고 formic acid와 이들의 축합반응으로 생성된 humins 또는 다른 부산물에 의해 저해 받는 것으로 판단된다 [26]. 또한 Kim [9]은 마이크로파 전처리 된 *U. pertusa* 효소 가수분해에서  $\alpha$ -amylase만을 사용하였을 때보다  $\alpha$ -amylase, cellulase 그리고  $\beta$ -glucosidase가 함께 포함된 효소 복합체를 사용하였을 때, 가수분해 수율을 10% 정도 향상시켰다고 보고하였다. 그리고 Jung 등 [27]은 *U. pertusa*의 효소 가수분해를 위한 산 전처리에 관한 연구에서, 0.1 M의 염산으로 121°C의 반응온도에서 15분의 반응시간동안 전처리 한 시료를 Viscozyme과 xylanase를 2:1의 비율로 섞은 효소복합체를 이용하여 58.8%의 효소 가수분해 수율을 얻었다고 보고 하였다.



(A)



(B)

Fig. 3. Post-hydrothermal enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis* hydrolysate. (A) After 30 min hydrothermal pretreatment; (B) After 60 min hydrothermal pretreatment; EH (Enzymatic Hydrolysis); IA after EH (Increasing Amount after Enzymatic Hydrolysis)

### 3.3 엄격 계수의 영향

창자과래의 열수 가수분해와 효소 가수분해를 통한 환원당 생성에 엄격 계수가 미치는 영향을 조사하였다. 엄격계수에는 열수 가수분해의 반응 온도와 반응시간이 결합되어 있는 함수로 표현하였다. 열수 가수분해에서(전처리) 총 환원당 농도는 엄격계수 3.84까지 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 4.1 이후로는 총 환원당 농도는 감소하는 경향을 나타내었다. 엄격계수 3.6과 4.1 사이의 열수 가수분해 반응온도는 190-210℃이며 반응시간은 30-60분이다. 이 결과를 통해 높은 엄격계수는 Fig. 3A에 나타나 있듯이 탄수화물의 과 분해를 유도하는 것으로 판단된다. 열수 가수분해 후 효소 가수분해에서 총 환원당의 농도는 엄격 계수 3.84 까지 20 g/L를 유지하며 3.84 이후에는 급격히 감소하는 것으로 나타났다. Fig. 3A에서 볼 수 있듯이 반응온도와 시간이 증가할수록 엄격 계수는 증가하였으며, 가혹한 반응 조건은 총 환원당 농도의 감소를 일으키는 것으로 나타났다. 또한 낮은 엄격계수의 열수반응 조건에서 형성된 잔여하는 고형물은 효소 반응에 의해 쉽게 가수분해 될 수 있다고 판단된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 해양바이오매스 자원인 녹조류 창자과래(*E. intestinalis*)의 바이오에너지 생산의 원료로서 가능성을 조사하였다. 열수 가수분해 및 효소 가수분해가 결합된 방법을 통해 과래로부터 환원당을 생성하였다. 열수 가수분해를 통해 1:10의 고액비, 170°C, 60분의 반응시간에서 7.3 g/L의 환원당이 생성되었다. 그리고 170°C, 30분간 열수 가수분해된 시료는 효소 가수분해를 통해 20.1 g/L의 환원당이 생성되었다. 또한, 높은 엄격계수는 열수가수분해에서 탄수화물의 과분해를 일으키는 것을 나타내었다. 이러한 결과는 해양 바이오매스인 창자과래로부터 바이오에너지 생산 공정에 기초적인 정보를 제공할 것으로 판단된다 [28].



## 참고문헌

- [1] Adams, J.M., Gallagher, J.A., Donnison, I.S., 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatment. *J. Appl Phycol* 21, 569-574.
- [2] Lee, S.Y., Ahn, J.W., Hwangm, H.J., Lee, S.B., 2011. Seaweed biomass resources in Korea. *KSBB Journal* 26, 267-276.
- [3] Lee, J.E., Lee, S.E., Choi, W.Y., Kang, D.H., Lee, H.Y., Jung, K.H., 2011. Bioethanol production using a yeast *Pichia stipitis* from the hydrolysate of *Ulva pertusa* Kjellman. *The Korean Journal of Mycology* 39(3), 243-248.
- [4] Jeong, G.T., Park, D.H., 2010. Production of sugars and levulinic acid from marine biomass *Gelidium amansii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 41-52.
- [5] Meinita, M.D.H., Hong, Y.K., Jeong, G.T., 2012. Comparison of sulfuric and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii), *Bioprocess Biosyst Eng.* 35, 123-128.
- [6] Meinita, M.D.H., Marhaeni, B., Winanto, T., Jeong, G.T., Khan, M.N.A.K., Hong, Y.K., 2013. Comparison of agarophytes

(*Gelidium*, *Gracilaria*, and *Gracilariopsis*), as potential resources for bioethanol production. J Appl Phycol. 25, 1957–1961.

- [7] Goh, C.S., Lee, K.T., 2010. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. Renew Sust Energ Rev. 14, 842–848.
- [8] Blomster. J., Back, S., Fewer, D.P., Kiirikki, M., Lehvo, A., Maggs, C.A., Stanhope, M.J., 2002. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. Am. J. Bot. 89, 1756–63.
- [9] Kim, J.K. 2010, Pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Ulva pertusa* Kjellman, Inha University, Incheon, Korea.
- [10] Feng, D., Liu, H., Li, F., Peng, J., Song, Q., 2011. Optimization of dilute acid hydrolysis of *Enteromorpha*. Chin J. Oceanol. Limnol. 6, 1243–1248.
- [11] Suganya, T., Gandhi, N.N., Renganthan, S., 2013. Production of algal biodiesel from marine macroalgae *Enteromorpha compressa* by two step process: optimization and kinetic study. Bioresour. Technol. 128, 392–400

- [12] Jeong, G.T., Kim, S.K., Park, D.H., 2013. Detoxification of hydrolysate by reactive-extraction for generating biofuels. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18, 88-93.
- [13] Kang, K.E., Park, D.H., Jeong, G.T., 2013. Effects of inorganic salts on pretreatment of *Miscanthus* straw. *Bioresource Technology* 132, 160-165.
- [14] Nitsos, C.K., Matis, K.A., Triantafyllidis, K.S., 2013. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *ChemSusChem.* 6(1), 110-122.
- [15] Jeong, G.T., Park, D.H., 2011. Production of levulinic acid from marine algae *Codium fragile* using acid-hydrolysis and response surface methodology. *KSBB Journal* 26, 341-346.
- [16] Park, D.H., Jeong, G.T., 2013. Production of reducing sugar from macroalgae *Saccharina japonica* using ionic liquid catalyst. *Korean Chem. Eng. Res.* 51(1), 106-110.
- [17] Yoon, B.T., Kim, Y.W., Chung, K.W., Kim, J.S., 2011. Enzymatic hydrolysis of pre-treated *Ulva pertusa* with alkaline peroxide. *Appl. Chem. Eng.* 22(3), 336-339.
- [18] Brosse, N., Hage, R., Sannigrahi, P., Ragauskas, A., 2010. Dilute

sulfuric acid and ethanol organosolv pretreatment of *Miscanthus x Giganteus*. Cellulose Chem. Technol. 44(1-3), 71-78.

[19] Pedersen, M., Meyer, A.S., 2010. Lionocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening, New Biotechnology 27(6), 739-750.

[20] Jang, J.S., Cho, Y.K., Jeong, G.T., Kim, S.K., 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. Bioprocess Biosyst Eng 35, 11 - 18.

[21] Song, B.B., Kim, S.K., Jeong, G.T., 2011. Enzymatic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 26, 347-351.

[22] Miller, G.L., 1959. Using dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31, 426-428.

[23] Deng, W., Zhang, Q., Wang Y., 2014. Catalytic transformations of cellulose and cellulose-derived carbohydrates into organic acids. Catalysis Today, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2013.12.041>

- [24] Shi, N., Liu, Q., Zhang Q., Qang, T., Ma, L. 2013. High yield production of 5-hydroxymethylfurfural from cellulose by high concentration of sulfates in biphasic system. *Green Chem.* 15, 1967-1974..
- [25] Whang, H., Deng, T., Wang, Y., Qi, Y., Hou, X., Zhu, Y., 2013. Efficient catalytic system for the conversion of fructose into 5-ethoxymethylfurfural. *Bioresour. Technol.* 136, 394-400.
- [26] Feng, Y., Qi, X., Jian, H., Sun, R., Jiang, J., 2012. Effect of inhibitors on enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification fermentation for lactic acid production from steam explosion pretreated *Lespedeza* stalks. *BioResources* 7(3), 3755-3766.
- [27] Jung, S.R., Kim, S.J., Kim, G.Y., Kim, R., 2012. Characteristics of enzymatic hydrolysis of *Ulva pertusa* kjellman by various pretreatments. *Journal of Korean Society of Urban Environment* 12(1), 1-7.
- [28] Kim, D.H., Lee, S.B., Jeong, G.T., 2014. Production of reducing sugar from *Enteromorpha intestinalis* by hydrothermal and enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 161. 348-353.

## Chapter II

# 거대녹조류 창자파래 추출물의 항산화 활성 평가

## 1. 서론

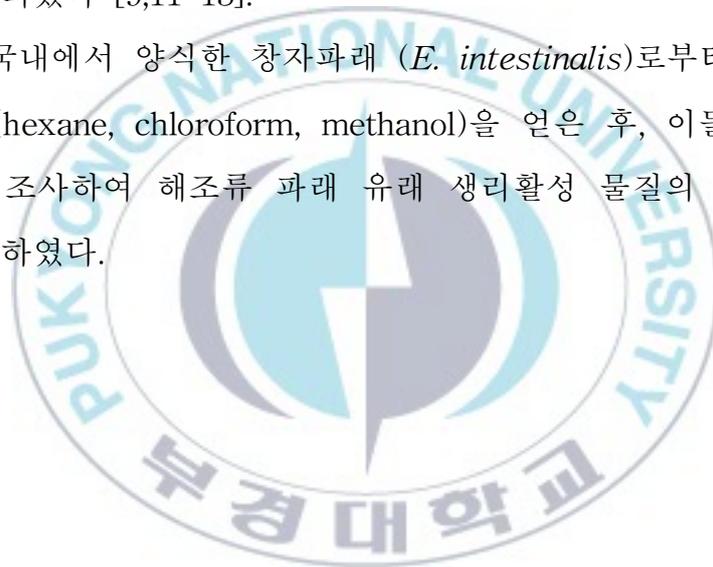
지구상의 동·식물로부터 항균, 항산화, 항암, 항염증 등의 효과가 있는 생리활성 물질에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 식품의 변질과 부패를 막고, 활성산소를 제거하기 위한 항균, 항산화 물질에 대한 연구가 육상의 식물을 비롯하여 바다의 해조류를 대상으로 한 연구가 보고되고 있다 [1-3].

모든 생물체들은 산소를 이용하여 에너지를 생성하는 과정에서 생성되는 활성산소의 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내의 DNA, 단백질, 당, 지질 등에 비선택적, 비가역적인 변형을 가져와 노화, 암, 뇌질환, 심장질환, 자가 면역질환, 동맥경화 등 질병의 원인이 되고 있다 [3-5]. 인위적으로 활성산소의 산화작용을 억제하기 위하여 항산화 물질을 사용하고 있다. 천연 물질로부터 vitamin C, tocotrienol, flavonoid, glutathione, carotinoid 등의 항산화물질을 얻을 수 있다. 또한 식품의 품질저하를 야기하는 산화반응을 차단하기 위하여 dibutyl-1-hydroxytoluene (BHT), dl- $\alpha$ -tocopherol, butyl hydroxyanisole (BHA), calcium disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA-Ca,Na), disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA-Na), nordihydroguaiaretic acid (NDGA), propyl gallate, erythorbic acid, isopropyl citrate, resin guaiac, sodium erythorbate 등과 같은 합성 항산화제를 사용하고 있다 [3,6]. 합성 항산화제는 효과와 경제성이 우수하나, 최근 안전성 문제가 제기됨에 따라 새로운 항산화 물질의 개발이 요구되고 있다 [3,7].

해조류 중 녹조류에 속하는 파래는 갈파래과에 속하며, 전세계적으로 널리 분포하고 있으며, 주로 해안의 바위에 부착하여 서식하고 있다. 우리나라에는 납작파래 (*Enteromorpha compressa*), 가시파래 (*E. prolifera*),

잎파래 (*E. linza*), 격자파래 (*E. clathrata*), 창자파래 (*E. intestinalis*) 등이 서식하고 있다 [6,8]. 본 연구에 사용된 창자파래 (*link confertii*; *E. intestinalis*)는 녹조식물문 갈파래목 (Ulvales) 갈파래과 (Ulvaceae)에 속한다. 형태는 둥근 대롱 모양을 하나, 광합성으로 인한 산소가 모여 쪼글쪼글하게 꼬이거나 불규칙하게 잘록해져 창자 모양을 나타내어 ‘창자파래’라 불리고 있다 [9,10]. 창자파래는 식품으로서의 영양성 연구뿐만 아니라, 항산화, 저분자 peptide의 기능성, 항돌연변이 활성 및 암성장 억제, angiotensin-1 전환효소 저해활성 등과 같은 생리활성 성분에 대한 연구도 보고되었다 [9,11-15].

본 연구는 국내에서 양식한 창자파래 (*E. intestinalis*)로부터 3가지의 용매 추출물 (hexane, chloroform, methanol)을 얻은 후, 이들 추출물들의 항산화능을 조사하여 해조류 파래 유래 생리활성 물질의 개발가능성을 확인하고자 하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

실험에 사용한 파래 (*Enteromorpha intestinalis*)는 2012년에 전남 진도에서 수확한 것을 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 항산화 활성 실험을 위하여 사용한 butylated hydroxyanisole (BHA)와 ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), chlorogenic acid는 Sigma-Aldrich Co.(USA) 제품을, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>와 DMSO는 Kanto chemical (Japan) 제품을, 그 밖에 Folin-Ciocalteu reagent는 Wako pure chemical Co. (Japan)의 제품을 사용하였다.

### 2.2. 추출 및 분획

항산화 활성 측정에 사용한 파래 추출물 시료는 파래 분말에 각각의 유기용매를 순차적으로 Soxhlet 추출기를 사용하여 추출하여 유기용매를 제거한 후, 일정농도가 되도록 DMSO에 녹여, 항산화 실험에 사용하였다. 사용한 추출용매로는 유전율(dielectric constant)에 따라 용매의 극성이 서로 다른 3가지의 용매 n-hexane (유전율 1.88) (A), chloroform (4.18) (B), methanol (33) (C)을 이용하여 순차적으로 추출하였다.

### 2.3. 항산화 활성

파래추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능, 환원력, superoxide

dismutase (SOD) 유사활성, 아질산 소거능을 대조구 (BHA, ascorbic acid)와 비교하였다.

### 2.3.1. DPPH radical 소거능

각 추출 분획의 DPPH radical 소거능 측정은 hydrazyl에 불안정한 상태의 질소원자가 수소원자를 받아들이는 성질을 이용해 항산화 물질과 반응하여 자체의 정색성을 소실하는 DPPH의 특성을 이용한 측정방법이다 [1-3]. 각 추출물 시료를 DMSO에 녹여 0.05-10 mg/mL의 농도로 조절하여 실험에 사용하였다. DPPH 용액은 DPPH 3 mg을 에탄올 15 mL에 녹인 용액 1.5 mL에 다시 에탄올 3 mL와 DMSO 0.5 mL를 혼합하여 제조하였다. DPPH 용액에 시료 50  $\mu$ L를 혼합하여 상온에서 10분간 반응한 후 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 50  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 반응 후 얻은 흡광도 값을 사용하였다. DPPH의 전자공여능 (electron donating ability, EDA)은  $EDA (\%) = (B-A)/B \times 100$  (A: 시료의 흡광도, B: 대조구의 흡광도)로 계산하였다. 대조구로 BHA, ascorbic acid를 사용하여 항산화 활성을 비교하였다 [1-3].

### 2.3.2. 환원력(Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay)

적당한 농도로 희석한 시료 0.2 mL에 200 mM sodium phosphate (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide 0.2 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응 후, 10% trichloroacetic acid 0.2 mL를 첨가 후 혼합하여 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 0.5 mL의 상등액에 0.1% ferric chloride 0.5 mL를 혼합 후 분광광도계를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다 [1,2]. 대조구로는 BHA와 ascorbic acid를 사용하였다.

### 2.3.3. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

시료 0.2 mL에 10 mM EDTA를 함유한 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응한 후, 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 분광광도계를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 BHA를 사용하였다. SOD 유사활성 (%) =  $[1 - (\text{실험구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도})] \times 100$  [1,2].

### 2.3.4. 아질산 소거능

각각의 시료 0.4 mL에 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1 mL를 첨가하고, 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액 (pH 3, 6)을 사용하여 반응액의 pH를 조정한다. 다음 반응액의 최종부피를 10 mL로 맞추었다. 반응액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 반응액을 각각 1 mL 취하여 여기에 2% acetic acid 5 mL, Griess reagent 0.4 mL를 가하여 잘 혼합하여 15분간 실온에서 방치하여 반응 후 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산 소거능은 다음과 같이 계산하였다. 아질산 소거능 (%) =  $[1 - ((\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{시료첨가군의 흡광도})] \times 100$  [1,2].

## 2.4. 총 페놀성 화합물의 함량

시료 중의 총 페놀성 화합물의 함량은 Folin-Denis법을 변형하여 측정하였다. 미지의 시료 0.1 mL에 2배 희석된 Folin-Ciocalteu phenol reagent 1 mL를 첨가하여 혼합 후, 실온에 3분간 반응시켰다. 반응 후, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 1 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 상층액을 분광광도계를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하여

총 페놀성 화합물의 함량을 계산하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다 [1-3].



### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 추출 및 분석

항산화 활성 측정에 사용한 파래 추출물 시료는 각각의 유기용매 (n-hexane, chloroform, methanol)를 순차적으로 Soxhlet 추출기를 사용하여 추출하였다. 추출시료 20 g에 추출용매 350 mL를 사용하여 색의 변화가 없을 때까지 5 시간 동안 추출하였다 (Fig. 1). 극성이 가장 강한 methanol이 가장 많은 추출수율을 나타내었다. 각각의 추출용매의 추출수율은 hexane 1.11%, chloroform 0.94%, 그리고 methanol 8.2%이었다. 실험에 사용한 파래 추출물은 각 용매별 추출물에서 유기용매를 제거한 후 DMSO에 녹여 일정 농도 (0-10 mg/mL)가 되도록 조절하여 항균 및 항산화 활성 실험에 사용하였다. 각각의 유기용매 추출물을 추출물 A (hexane), B (chloroform), 그리고 C (methanol)로 명명하였다.

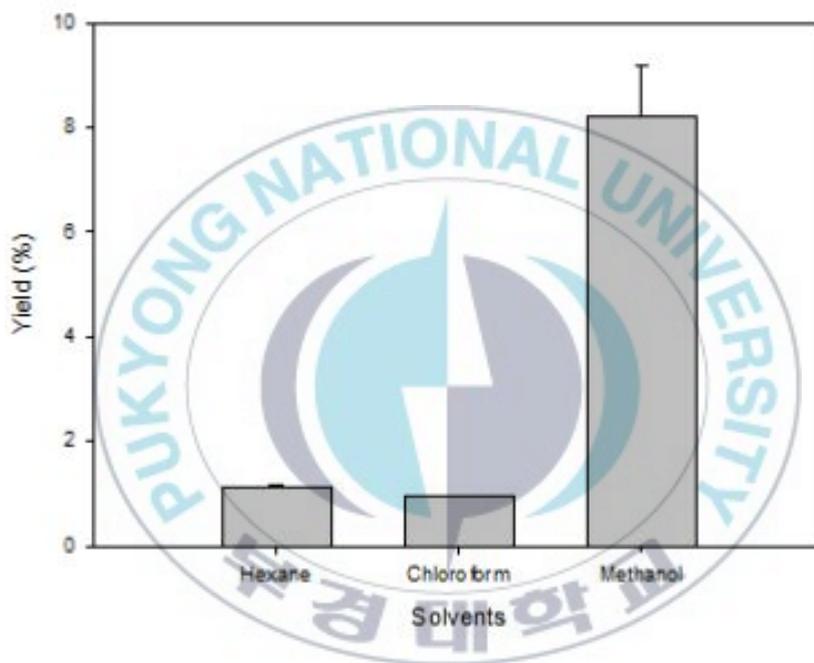


Fig. 1. Effect of solvent on lipid extraction of *E. intestinalis* using soxhlet extractor.

### 3.2. 총 페놀성 화합물의 함량

시료 중의 총 페놀성 화합물의 함량을 페놀성 물질이 phosphomolybdate와 반응하여 청색을 나타내는 현상을 이용한 Folin-Denis법을 변형하여 측정된 결과 (Table. 1), 1 mg/mL 농도의 추출물 A, B, C 시료 중의 총 페놀성 화합물의 함량은 각각  $4.03 \pm 0.05\%$ ,  $8.15 \pm 0.00\%$ ,  $2.33 \pm 0.09\%$ 로 나타났다. B 분획 (chloroform) 시료에서 가장 많은 양의 페놀성 화합물이 함유되어 있음을 확인하였다.



Table 1. Content of total phenolic compounds in extracts A, B and C of *E. intestinalis*

Extracts	Content (%)
Hexane extract (A)	4.03±0.05
Chloroform extract (B)	8.15±0.00
Methanol extract (C)	2.33±0.09

### 3.3. 항산화 활성

#### 3.3.1. DPPH radical 소거능

각 추출 분획의 DPPH radical 소거능 측정은 항산화 물질과 반응하여 자체의 정색성을 소실하는 DPPH의 특성을 이용한 방법으로 측정하였다 [1-3]. 0.05 mg/mL에서 10 mg/mL의 농도에서 실험한 결과 (Fig. 2), 실험에 사용한 추출물 A, B, C 모두, 대조구로 사용한 BHA, ascorbic acid와 비교하여 항산화 활성이 낮았다. 시료의 농도가 증가할수록 직선적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 보였다. 1 mg/mL에서의 DPPH radical 소거능을 비교한 결과, 추출물 A, B, C에서는 각각 17.2%, 14.1%, 3.8%를 나타내어 대조구로 사용한 ascorbic acid 62.9%, BHA 96.1%에 비하여 낮은 값을 나타내었다. 추출물 A는 BHA에 비하여 5.5배 낮은 DPPH radical 소거능을 나타내었다. 김 등[1]은 미역 열수 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 시료의 농도가 5 mg/mL까지는 거의 비슷한 낮은 값 (2.9%)를 보였으며, 50 mg/mL에서 70.1%의 소거능을 얻었다고 보고하였다. 이때 대조구로 사용한 ascorbic acid의 소거능은 2.5 mg/mL에서 92.3%를 보고하였다. 다시마 열수추출물의 경우에는 2.5-50 mg/mL의 농도로 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 시료 농도 증가에 따라 소거능이 증가하여 1 mg/mL에서는 약 6%, 5 mg/mL에서는 약 15%, 10 mg/mL에서는 약 30%, 그리고 50 mg/mL에서는 86.4%가 제거되었다고 보고되었다 [2].

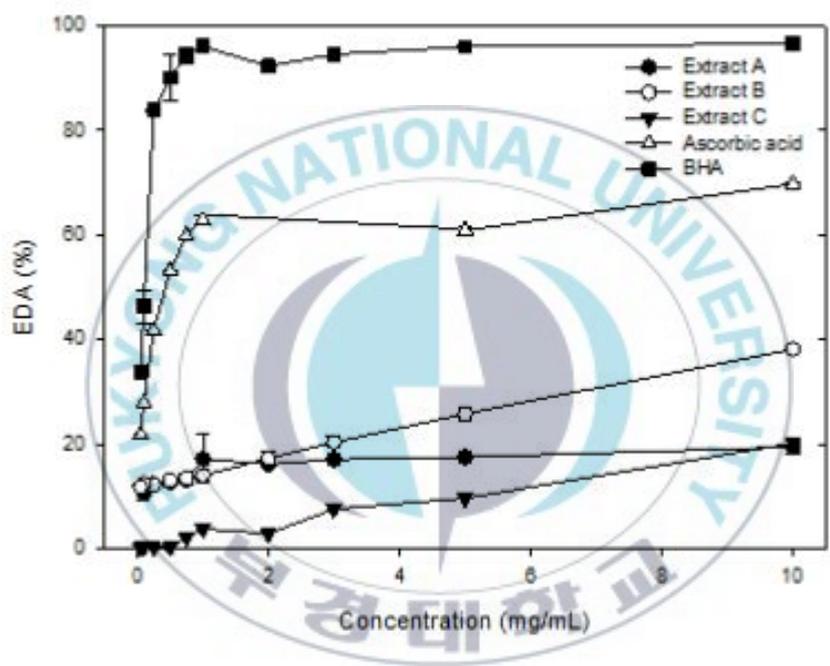


Fig. 2. Effect of *E. intestinalis* extracts on the DPPH radical scavenging activity.

### 3.3.2. 환원력 (*Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay*)

환원력은 항산화 활성과 밀접한 관계를 가지고 있다고 알려져 있으며, 시료의 특성과 농도, 추출용매 등에 따라 다른 값을 나타낸다 [1,2]. 실험에 사용한 추출물 A, B, C 모두에서 대조구로 사용한 BHA, ascorbic acid와 비교하여 환원력이 5 mg/mL 이하에서는 낮게 나타났다 (Fig. 3). 농도가 증가할수록 직선적으로 증가하는 경향을 보였다. 10 mg/mL의 높은 농도에서는 B와 C의 경우에는 대조구 (ascorbic acid)에 비해 높게 나타났다. 추출물 A, B, C의 경우에는 DPPH radical 소거능 결과 (Fig. 2)와는 다르게 추출물 C가 가장 높은 환원력을 나타내었으며, 추출물 A가 가장 낮았다. 미역 열수추출물의 경우에는 5 mg/mL까지는 매우 낮은 환원력 결과를 보였고, 50 mg/mL에서 약 3배의 환원력이 증가되었다고 보고되었으나, 대체적으로 대조구 (ascorbic acid)에 비하여 낮은 값을 보고하였다 [1]. 다시마 열수추출물을 0.01-100 mg/mL까지 첨가하여 환원력을 측정한 결과에 의하면 시료의 농도가 증가할수록 환원력도 증가하였고, 총 페놀함량이 증가함에 따라 환원력도 증가하는 경향을 보고하였다 [2].

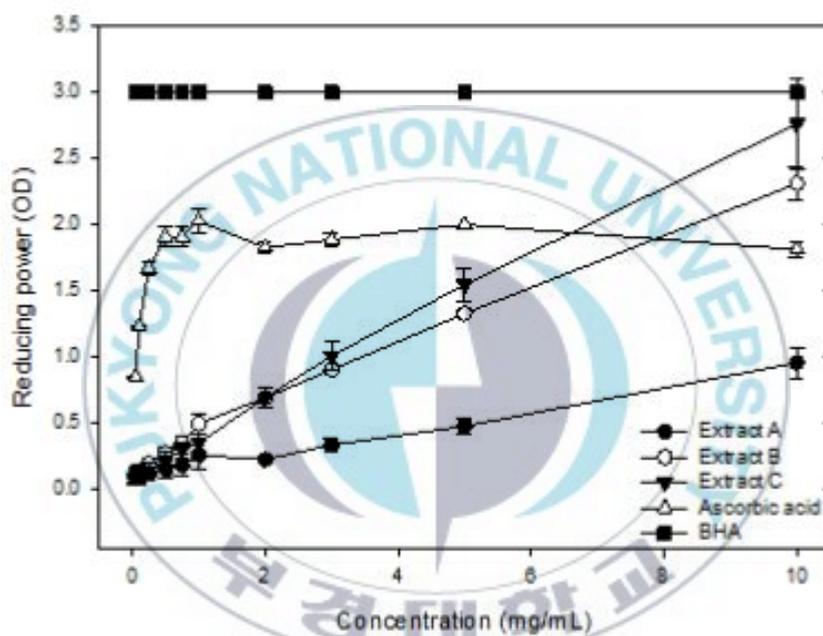
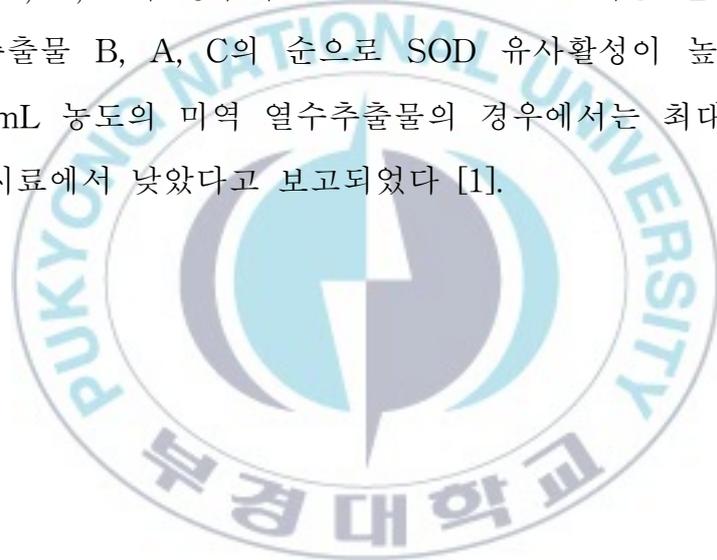


Fig. 3. Ferric reducing antioxidant power assay of *E. intestinalis* extracts.

### 3.3.3. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성

Superoxide dismutase (SOD)는 세포에 유해한 화학종을 과산화수소 ( $H_2O_2$ )로 전환시키는 효소이다 [1]. 이와 유사한 화학반응을 대상으로 시료의 항산화능을 조사하였다. 실험에 사용한 추출물 A, B, C는 모두 대조구로 사용한 BHA와 비교하여 항산화 활성이 낮았다 (Fig. 4). 농도가 증가할수록 시료 B는 조금 증가되는 경향을 나타냈다. 실험에 사용한 시료 모두에서 1 mg/mL 이상에서는 큰 변화 없이 일정한 값을 나타내었다. 추출물 A, B, C의 경우에는 DPPH radical 소거능 결과 (Fig. 2)와 유사하게 추출물 B, A, C의 순으로 SOD 유사활성이 높게 나타났다. 0.5-50 mg/mL 농도의 미역 열수추출물의 경우에는 최대 약 13% 정도로 모든 시료에서 낮았다고 보고되었다 [1].



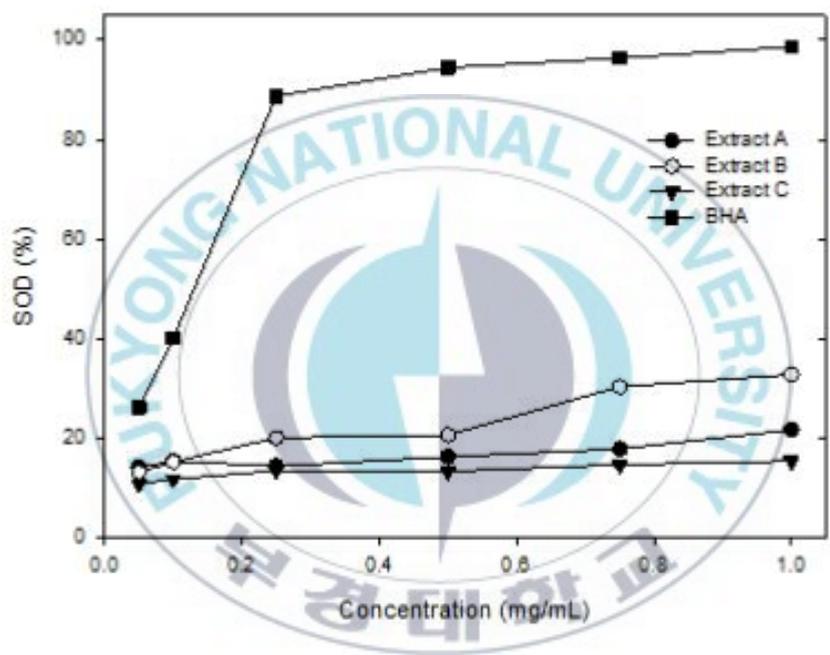


Fig. 4. Superoxide dismutase(SOD)-like activity of *E.. intestinalis* extracts.

### 3.3.4. 아질산 소거능

아질산염은 식품에 첨가하여 발색, 독소생성 억제, 산패 방지 등의 용도로 사용되고 있으나, 발암성 물질인 니트로사민의 생성반응 전구체로 알려져 있어 아질산염에 대한 소거능력이 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다 [1,2]. 본 연구에서 사용한 시료의 아질산 소거능을 확인한 결과, 5 mg/mL 이하에서는 실험에 사용한 시료 B, C 모두 대조구로 사용한 BHA와 ascorbic acid에 비하여 아질산 소거능이 낮게 나타났다 (Fig. 5). 실험에 사용한 시료 중 추출물 A에서 상대적으로 높은 아질산 소거능을 보였으나, 대조구로 사용한 ascorbic acid와 BHA에 비해서는 낮은 값을 나타내었다. 시료의 농도가 증가할수록 아질산 소거능도 증가하는 경향을 보였다. 반면에 미역 열수추출물의 아질산 소거능의 결과, 1 mg/mL 까지는 거의 활성을 보이지 않은 반면 5 mg/mL에서는 30.1%의 소거능을 보였고, 대조구로 사용한 ascorbic acid의 경우에는 5 mg/mL 이상에서는 거의 100%의 소거 활성을 보고하였다 [1]. 또한 다시마 열수추출물의 경우에는 아질산염 소거능이 농도가 증가할수록 증가하여 5 mg/mL에서 47.6%, 100 mg/mL에서는 86.2%가 제거되었다고 보고되었다 [2].

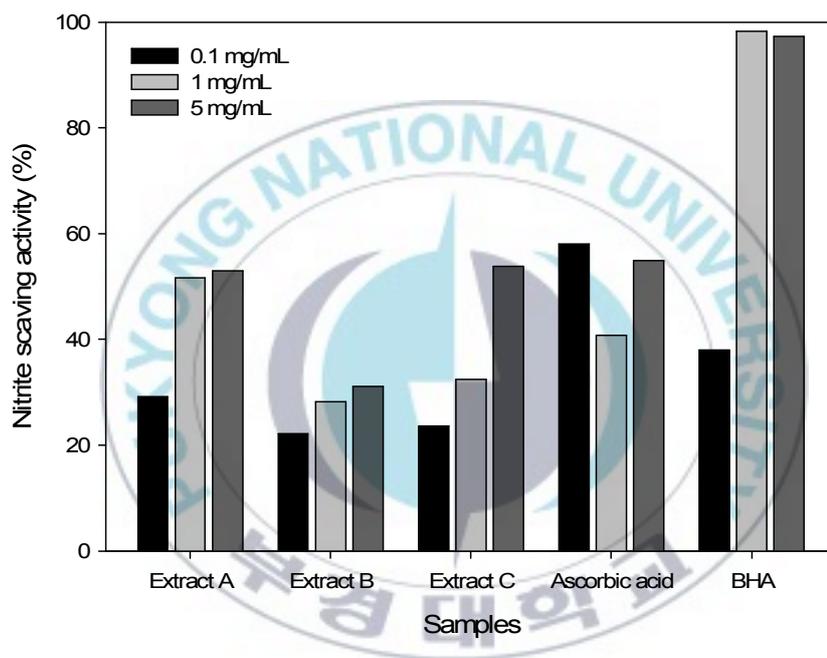


Fig. 5. Nitrite scavenging activity of *E. intestinalis* extracts.

#### 4. 결론

본 연구에서는 국내에서 양식한 창자파래 (*E. intestinalis*)로부터 추출한 3가지의 추출물 (hexane, chloroform, methanol)을 대상으로 항산화능을 조사하였다. 추출수율은 hexane (A) 1.11%, chloroform (B) 0.94%, 그리고 methanol (C) 8.2%이었다. 추출물 A, B, C 중의 총 페놀성 화합물의 함량은 각각 4.03%, 8.15%, 2.33%로, 추출물 B (chloroform) 시료가 가장 많은 양의 페놀성 화합물이 함유되어 있었다. 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH radical 소거능, SOD 유사활성, 환원력, 아질산 소거능에 대한 실험을 수행한 결과, DPPH radical 소거능과 SOD 유사활성은 추출물 B, A, C의 순으로 높았다. 반면에 환원력 측정에서는 추출물 C가 가장 높았으며, 추출물 A가 가장 낮았다. 아질산 소거능에서는 시료 중 추출물 A에서 상대적으로 높았으나, 대조구로 사용한 ascorbic acid와 BHA에 비해서는 낮은 값을 나타내었다. 시료의 농도가 증가할수록 항산화 활성도 증가하는 경향을 보였다. 위의 연구결과로부터 창자파래 추출물의 식품소재 및 생리활성 물질로의 개발가능성을 확인하였다 [17].

## 참고문헌

- [1] Kim, Y. S., H. G. Nam, H. J. Shin, M. S. Na, M. H. Kim. C. W. Lee, J. Soo Kim, Y. L. Piao, and W. S. Cha (2011) Effect of hot water extract of *Undaria pinnatifida* on the activities of antioxidant and nitrite scavenging. *KSBB J.* 26: 151-156.
- [2] Kim, Y. S., C. O. Kang, M. H. Kim, W. S. Cha, and H. J. Shin (2011) Contents of water extract for *Laminaria japonica* and its antioxidant activity. *KSBB J.* 26: 112-118.
- [3] Jeong, G. T., K. M. Lee and D. H. Park (2006) Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem. Eng. Res.* 44 81-86.
- [4] Aruoma, O. I., (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 32(7): 671-754.
- [5] Davies, K. F., and A. L. Goldberg (1987) Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* 262(17): 8227-8261.
- [6] 한국식품과학회 (2008) *식품과학기술대사전*. 광일문화사, 한국.
- [7] Choe, S. Y. and K. H. Yang (1982) Toxicological studies of

antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxy anisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technol.* 14(3): 283-288.

[8] [http://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/master.do?\\_method=view&MAS\\_IDX=101013000726628](http://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/master.do?_method=view&MAS_IDX=101013000726628)

[9] 한용봉 (2010) *식용해조류 II - 성분과 생리활성*. pp.262-269. 고려대학교 출판부, 한국.

[10] 이용필 (2008) *제주도의 바닷말*. 아카데미서적, 한국.

[11] Kwak, C. S., S. A. Kim, and M. S. Lee (2005) The Correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.* 34: 1143-1150.

[12] Kim, S. A., J. Kim, M. K. Woo, C. S. Kwak and M. S. Lee (2005) Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *Korean Soc Food Sci Nutr.* 34: 451-459.

[13] Park, J. H., K. C. Kang, S. B. Baek, Y. H. Lee and K. S. Rhee (1991) Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 256-261.

- [14] Lee, H. O., D. S. kim, J. R. Do, Y. S. Ko (1999) Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish. Soc.* 32: 427-431.
- [15] Choi, J. S., J. H. Lee and J. H. Jung (1997) The screening of nitrite scavenging effect of marine, algae and active principles of *Ecklonia Stolonifera*. *J. Korean Fish. Soc.* 30: 909-915.
- [16] Song, J. H., S. H. Song, Y. G. Yang, B. G. Son, Y. W. Choi and J. S. Kang (1999) Antimicrobial activity of extract from *Smilax china*. *J. Agri Tech. & Dev. Inst.* 3: 163-168.
- [17] Kim, D. H., and Jeong, G. W. (2014) Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine green-algae *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* 29(2): 92-97.

## 감사의 글

제가 대학원 과정을 무사히 마칠 수 있도록 도움을 주신 분들에게 감사의 말씀을 전하고자 합니다. 먼저 부족한 저를 아낌없는 지도와 격려로 이끌어주신 정귀택 교수님께 고개 숙여 감사드립니다. 또한 바쁜 와중에도 졸업논문 심사를 맡아 주신 김성구, 김중균 교수님과 많은 가르침을 주신 생물공학과 교수님 홍용기, 박남규, 공인수, 이형호 교수님께도 감사의 인사를 전합니다.

바이오에너지공학 실험실 선배 원일이형, 부복이형, 열심히 공부중인 상범이, 후배 아람이, 오민이 그리고 졸업논문발표를 통해 함께 실험실 생활 하였던 모든 분들에게 감사합니다.

5년동안 희노애락을 같이 하며 항상 큰 힘이 되어준 경환이형, 다른 실험실이지만 누구보다 많은 시간을 함께 해준 태영이 그리고 창한이, 이제는 친구보다 더 친구 같은 현이, 모두에게 감사합니다. 또한 같지만 서로 다른 위치에서 함께 하며 저를 도와준 대학원 동기 규유, 지영, 다솜, 진영이형, 주현이 그리고 항상 편안하고 친근하게 다가와준 학과후배 장현, 태관, 석현, 동섭, 종엽, 진한, 화진, 재완, 도훈 이 모두에게 감사합니다.

끝으로 석사학위를 무사히 마칠수 있도록 끝까지 뒷바라지 해주시느라고생만 하시는 아버지, 어머니, 그리고 누나에게 감사의 인사를 바칩니다.