



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

工學碩士 學位論文

쉬와넬라 오나이덴시스 PKA 1008  
유래 효소처리와 감마선 처리에 의한  
미역뿌리(*Undaria pinnatifida* roots)와  
참모자반(*Sargassum fulvellum*) 추출  
분해물의 특성 및 염증억제능의 변화



2019年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

徐 曉 潼

工學碩士 學位論文

쉬와넬라 오나이덴시스 PKA 1008  
유래 효소처리와 감마선 처리에 의한  
미역뿌리(*Undaria pinnatifida* roots)와  
참모자반(*Sargassum fulvellum*) 추출  
분해물의 특성 및 염증억제능의 변화

指導教授 安東賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2019年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

徐 曉 潼

徐 曉 潼 의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2019年 2月



주 심

공학박사

전 병 수



위 원

농학박사

조 승 목



위 원

농학박사

안 동 현



# 목 차

Abstract .....	iv
서 론 .....	1
재료 및 방법	
1. 재 료	
1-1. 시험균주 .....	5
1-2. 실험 재료 및 시약 .....	5
2. 방 법	
2-1. 효소분해 .....	8
2-1-1. 조효소액의 제조 .....	8
2-1-2. 효소분해물의 제조 .....	8
2-1-3. 효소분해물의 특성 .....	8
2-1-3-1. pH .....	8
2-1-3-2. 색도 .....	9
2-1-3-3. 환원당 및 점도 .....	9
2-1-4. 산업적 이용 가능성 .....	11
2-1-4-1. 분해물의 저분자화 .....	11
2-1-4-2. 염증억제능 .....	11
2-2. 감마선처리 .....	13

2-2-1. 감마선 조사 .....	13
2-2-2. 감마선분해물의 특성 .....	14
2-2-2-1. pH .....	14
2-2-2-2. 색도 .....	14
2-2-2-3. 환원당 및 점도 .....	14
2-2-3. 산업적 이용 가능성 .....	14
2-2-3-1. 분해물의 저분자화 .....	14
2-2-3-2. 염증억제능 .....	15
2-3. 통계처리 .....	15
<b>결과 및 고찰</b>	
1. 효소분해 .....	16
1-1. 효소분해물의 특성 .....	16
1-1-1. pH .....	16
1-1-2. 색도 .....	19
1-1-3. 환원당 및 점도 .....	21
1-2. 산업적 이용 가능성 .....	23
1-2-1. 분해물의 저분자화 .....	23
1-2-2. 항염증 효과 .....	26
2. 감마선 조사에 의한 저분자화 .....	38
2-1. 감마선분해물의 특성 .....	38
2-1-1. pH .....	38
2-1-2. 색도 .....	41

2-1-3. 환원당 및 점도 .....	43
2-2. 산업적 이용 가능성 .....	45
2-2-1. 분해물의 저분자화 .....	45
2-2-2. 항염증 효과 .....	48
 요 약 .....	 58
참 고 문 헌 .....	62



Characterization and Anti-inflammatory effect of  
Extracts from Enzymatic Using Crude Enzyme by  
*Shewanella oneidensis* PKA 1008 and  
Gamma-irradiation on *Undaria pinnatifida* roots and  
*Sargassum fulvellum*

Xiaotong Xu

*Department of Food Science and Technology,  
Graduate School, Pukyong National University*

**Abstract**

Marine algae are important marine resources, with abundant reserves and a wide variety. Algae polysaccharide is a biologically active substance. A large number of studies have shown that Algae polysaccharides have many biological activities such as antiviral, immune regulation, antitumor and antioxidant. However, in many of industrial applications low viscosity of polysaccharides is required. Alginate is the polysaccharide obtained from brown algae and is composed of 1,4-linked  $\beta$ -D-mannuronic acid and  $\alpha$ -L-guluronic acid. In order to use alginate more effectively, alginate can be depolymerize by acid hydrolysis, enzymatic treatment and gamma radiation degradation and so on. The aim of this study was to investigate

the characterization and functionality of *Undaria pinnatifida* roots (UPT) and *Sargassum fulvellum* (SF) extracts degraded using crude enzyme by *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and gamma-irradiation. Firstly, in order to obtain the optimum degrading condition for the UPT and SF, the UPT and SF were respectively mixed with crude enzymes from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and incubated at ratio of 1:1 (v/v) for 0-48 h. And the changes in pH, reducing sugar, viscosity and color were measured with increasing incubation time. As the incubation time increased, the pH value and viscosity were decreased. The highest reducing sugar content of UPT and SF is respectively 250.68 µg/mL and 231.60 µg/mL at 24 h. The effects of enzymatic extract on nitric oxide(NO) and cytokine(IL-6, TNF-α, IL-1β) secretion. The UPT and SF production of NO, cytokine were inhibited. Then, the UPT and SF were irradiated with gamma irradiation in dosages ranging from 3 to 20 kGy to determine the effect of radiation on the alginate properties of UPT and SF, such as pH value, reducing sugar, viscosity and color. As the gamma-irradiation dosage increased, the reducing sugar of UPT and SF were increased and viscosity were decreased. When the UPT and SF production was irradiated by gamma-irradiation, the UPT and SF production of NO, cytokine were inhibited. These results indicated that crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 can be used to enhance the polysaccharide degradation of UPT and SF, and 24 h was effective to produce alginate oligosaccharide. In addition, the high gamma dosage can enhance the polysaccharide degradation with immune activities.

## 서 론

최근 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 식생활의 건강 지향, 다양화 및 고급화로 인하여 천연 식품에 대한 요구가 증가하고 있다(Liu et al., 2013). 특히 비만, 고혈압, 당뇨 및 심장질환 등의 성인병이 급증함에 따라 식이섬유소로써 해조류에 대한 관심이 높아지고 있으며, 세계적으로 해조 원료를 식용자원으로 이용하고 있는 추세이다. 이에 따라 해조 원료가 건강보조식품, 생리활성물질의 공급원 등으로써 각광을 받고 있으며, 해조류의 이용은 계속해서 증가할 것으로 전망되고 있다( Lee et al., 2010). 해조류는 빛깔에 따라 갈조류(brown algae), 녹조류(green algae), 및 홍조류(red algae)로 나뉘며, 전 세계적으로 약 200여 종의 해조류가 생산되고 있다. 갈조류의 대표종으로는 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*) 및 톳(*Hizikia fusiforme*) 등이 있으며 탄수화물 함량이 약 30~60%로 alginate, fucoidan, laminaran 및 mannitol 등의 다당류를 함유하고 있다. 녹조류는 납작파래(*Enteromorpha compressa*), 갈파래(*Ulva lactuca*), 홑파래(*Monostroma nitidum*), 청각(*Codium fragile*) 및 매생이(*Capsosiphon fulvescens*) 등이 대표 종으로 탄수화물 함량이 약 48~55%로 cellulose, pectin, mannan 및 xylan 등의 다당류를 함유하고 있다. 홍조류는 탄수화물이 약 40~75%로 agarose, carrageenan 및 porphyran 등의 다당류를 함유하며, 김(*Porphyra tenera*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*) 및 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)가 대표 종으로 알려져 있다(Kim et al., 2011; Kim et al., 2012). 갈조류는 탄수화물 중 알긴산이 수확시기에 따라 약 70~80% 함유되어 있다. 알긴산은 갈조류의 세포벽을 구성하는 다당류로써 2종류의 uronic acid인  $\beta$ -D-mannuronic acid(M)와  $\alpha$ -L-gluronic acid(G)로

이루어져 있으며,  $\alpha$ -1,4 또는  $\beta$ -1,4 결합을 하고 있다(Park and Jeong, 2013). 알긴산은 안정제, 농후제 및 유화제 등의 재료로 식품산업에 널리 이용되고 있다(An and Lee, 2000). 하지만 알긴산은 상온에서 용해되는데 시간이 많이 소요되고 농도가 증가함에 따라 점성이 커지는 등의 문제점이 있어 산업적 이용이 제한되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 다당류의 저분자화 연구가 진행되고 있으며(Rehm et al., 1997), 현재까지 알려진 고분자 다당류의 올리고당화 방법에는 가열가수분해, 방사선 조사, 화학적 분해 및 효소에 의한 분해법 등이 있다(Song et al., 2007).

이전 연구에서는 미생물 유래 효소를 이용한 알긴산의 저분자화 연구(Stevens et al., 1977; Linker et al., 1984)와 감마선을 이용한 알긴산의 저분자화 연구(Lee et al., 2003; Cho et al., 2003; Song et al., 2007) 등이 보고된 바 있으며, 알긴산 분해효소는  $\beta$ -제거반응을 통해 uronic acid 중합체의 1,4 glycosidic 결합을 분해하여 불포화성 비환원성 말단을 발생시킨다(Woog et al., 2000; Zhu and Yin, 2015)고 밝혀진 바 있다. Sunwoo 등(2013)의 연구에서는 녹조류 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 *Shewanella oneidensis* 계통의 균주를 분리하여 *Shewanella oneidensis* PKA 1008로 명명하였고, 알긴산 분해 조효소 생산의 최적조건과 특징에 대해 보고하였다. 또한 Kim 등(2015)은 알긴산 분해 효소를 통해 제조된 알긴산 올리고당의 항염증 효과에 대해 보고하였다. 감마선 조사는  $\beta$ -glucan, laminarin 및 fucoidan과 같은 다당류를 교차 결합, 접목 및 분해에 의해 저분자화시키는 유용한 물리적 방법으로 인식되어왔다(Byun et al., 2008; Choi et al., 2011; Choi et al., 2013). 이전 연구에서는 감마선 조사를 통해 전자파가 glycosidic bond를 분열하여 다당류를 저분자화시킬 수 있음을 보고하였다(Byun

et al., 2008; Choi et al., 2013; Zainol et al., 2009). 감마선으로 고분자를 분열시키는 방법은 화학물질을 첨가하지 않고 중복, 정량적으로 변화를 촉진하고 온도, 환경, 첨가제를 제어하는 특수 장비 및 기구가 필요하지 않다. 따라서 감마선 조사는 화학적 방법에 비해 처리시간이 짧고 비용이 저렴하며 친환경 등의 장점을 가지고 있다. 또한 감마선 조사는 다당류를 저분자화할 때 멸균 기능도 있다는 보고가 있으며(Lotfy, 2009), 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)물 추출물은 감마선 조사를 통해 항염증 작용이 더욱 효과적으로 증가한다고 보고되고 있다(Lee et al., 2011).

미역(*Undaria pinnatifida*)은 한국에서 이용되고 있는 대표적인 식용 미역과의 갈조류이다. 미역은 무기질과 비타민 등의 영양성분을 풍부하게 함유하고 있으며 기능성 지방산 및 광물질 함량이 풍부하다(Choi et al., 1992; Kim and Choi, 1994). 이러한 미역은 주로 잎과 줄기만 이용되고, 뿌리는 활용 되지 못한 채 폐기되어 바다에 버려짐으로써 환경오염을 유발하고 있다. 미역뿌리에 관한 연구로는 에탄올 추출물의 항염증 효과에 대한 연구(Kang et al., 2014) 등이 보고되고 있지만, 미생물 유래의 효소처리 및 감마선 조사를 통한 저분자화 등의 고부가가치 이용에 관한 연구는 부족한 실정이다.

참모자반(*Sargassum fulvellum*)은 한국의 연안에 분포하고 있는 난해성 다년생 갈조식물로써 연안동물들이 먹이를 얻거나 산란하기 적합한 곳에 주로 서식하고 있는 대표적인 식용해조류이다(Jeong et al., 2012). 참모자반에 대해서는 항균 및 항산화 효과(Lee et al., 2000; Lee et al., 1996)에 관한 일부 연구가 보고되고 있을 뿐, 미생물 유래의 효소처리 및 감마선 처리를 통한 항염증에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 유래 효소처

리와 감마선 처리에 의한 미역뿌리와 참모자반에 함유되어 있는 다당류를 알긴산 올리고당으로 저분자화 하고자 한다. 또한 저분자화된 알긴산 올리고당의 특성 및 항염증 효과를 확인하고자 한다.



## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1-1. 시험균주

본 실험에서 이용한 균주는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 균주로 부산 연안 송정 앞바다에서 분해가 진행 중인 녹조류 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 분리하여 사용하였다.

#### 1-2. 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 참모자반(*Sargassum fulvellum*)은 2010년도 부산 송정에서 채취하고, 미역뿌리(*Undaria pinnatifida* roots)는 (주)석하에 제공 받았으며 담수로 깨끗하게 수세하였다. 이후 하루정도 1차로 자연 건조 후 2차 동결 건조한 다음, 이를 분말화 및 진공 포장하여 -20℃에서 보관하며 사용하였다. 시료의 일반성분(Table 1)을 분석한 결과, 미역뿌리 및 참모자반의 조지방은 각각 0.67%와 9.06%, 조단백질은 0.67%와 9.06%, 수분은 8.19%와 2.04%, 조회분은 20.86%와 19.58%이었다. 그리고 미역뿌리 및 참모자반의 총당은 각각 56.81%, 63.94%이었다. Marine broth(MB)는 Difco사의 제품을, Sodium azides는 Junsei사의 제품을 사용하였다. 구리시약 D는 구리시약 A와 구리시약 B를 25:1의 비율(v/v)로 혼합하여 제조하였다. 구리시약 A는 sodium carbonate anhydrous, potassium sodium tartrate tetrahydrate, sodium bicarbonate 및 sodium sulfate로 제조하였다. 구리시약 B는  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 제조하였

다. Sodium bicarbonate는 Sigma사의 제품을 사용하였고. Sodium carbonate anhydrous, potassium sodium tartrate tetrahydrate 및  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 는 Yakuri사에서 구입하여 사용하였다.



Table 1. Characteristics of *Undaria pinnatifida* roots and *Sargassum fulvellum*

(unit: %)

	Characteristics				
	Crude lipids	Crude protein	Moisture	Crude ash	Carbohydrate
<i>Undaria pinnatifida</i> roots	0.67±0.02	12.44±0.19	8.19±0.20	20.86±0.17	56.81±0.08
<i>Sargassum fulvellum</i>	9.06±0.11	19.83±0.23	2.04±0.10	19.58±0.07	63.94±4.55

## 2. 방 법

### 2-1. 효소분해

#### 2-1-1. 조효소액의 제조

*Shewanella oneidensis* PKA 1008은 최적조건인 pH 9, 2% NaCl, 30°C에서 24시간 배양하였다. 이후 원심분리기(Supra 30K, Hanil Science Co., Korea)를 이용하여 4°C에서 10,000×g로 30분간 원심 분리하였고, 상층액을 조효소액으로 이용하였다. 이 때 사용한 조효소액의 활성은 490 U/mL이었다.

#### 2-1-2. 효소분해물의 제조

미역뿌리 및 참모자반 분말을 10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 80 mg/mL 농도로 제조하였고, *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액의 최적 생육 pH는 1 N NaOH를 이용하여 pH 9로 맞추었다. 80 mg/mL의 농도로 제조된 미역뿌리와 참모자반 시료 각각은 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1의 비율(v/v)로 혼합하였다. 이때 미생물에 오염되지 않게 sodium azide(0.02%)를 첨가하였다. 각 시료는 30°C에서 0, 3, 6, 12, 24 및 48시간 동안 반응시켰다.

#### 2-1-3. 효소분해물의 특성

##### 2-1-3-1. pH

미역뿌리 및 참모자반 추출분해물의 pH측정은 pH meter(HM-30V, TOA, Kobe, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 2-1-3-2. 색도

색도 측정은 미역뿌리 및 참모자반 추출 분해물을 액체시료용 cell에 취한 후, 색차계(JC801, Color Technosystem Co., Tokyo, Japan)를 이용하여  $L^*$ (명도),  $a^*$ (적색도),  $b^*$ (황색도) 등을 측정하였다. 측정은 최소 5회 이상 반복하여 평균값을 구하였다. 이때 사용된 표준색판의 값은  $L^*=98.98$ ,  $a^*=0.21$ ,  $b^*=-0.28$ 이었다.

### 2-1-3-3. 환원당 및 점도

환원당의 함량 변화를 측정하기 위하여 Somogyi-Nelson 법(Nelson, 1994)을 이용하여 측정하였다. Test tube에 시료 0.5 mL와 구리시약 D 0.5 mL를 각각 넣은 후, water bath에서 20분간 가열하여  $Cu_2O$ 을 생성시키고, 몰리브덴산용액 1 mL를 산성조건하에서 첨가하여 발색시켰다. 그 다음 분광 광도계(Thermo Spectronic Rochester, NY, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준당(glucose)으로 작성한 검량 곡선(Fig. 1)을 통해 환원당을 정량하였다. 환원당 standard curve는 1 mg/ml glucose를 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 0  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 측정된 환원당 함량으로 도출하였다.

점도 변화를 측정하기 위해 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 사용하였으며, Stevens와 Levin(Steven et al., 1976)의 방법을 참고하여 25°C, 30 rpm의 조건에서 40 cP spindle을 사용하여 측정하였다.

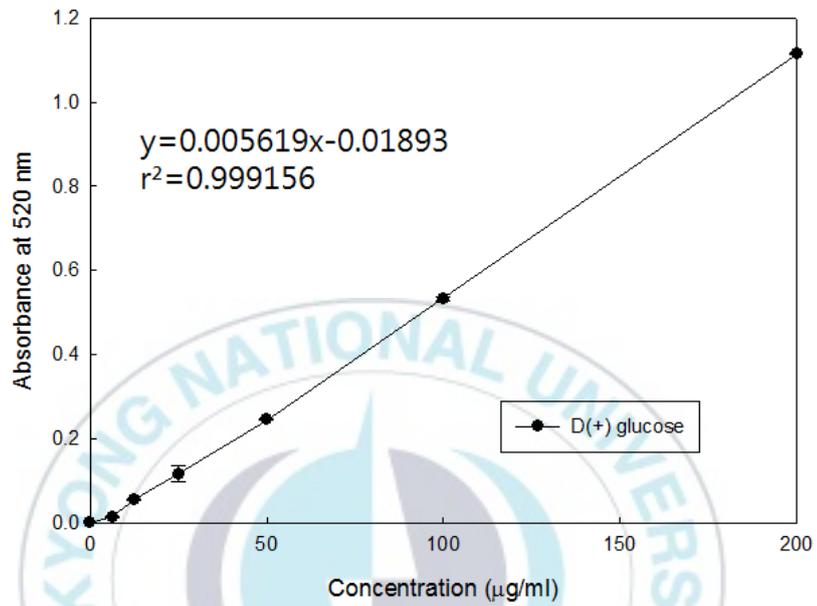


Fig. 1. Standard curve for determination of reducing sugar.

## 2-1-4. 산업적 이용 가능성

### 2-1-4-1. 분해물의 저분자화

미역뿌리와 참모자반 시료를 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 각각 혼합하여 0, 3, 6, 12, 24 및 48시간 동안 반응시켰다. 각 시간별로 반응시킨 분해액의 효소를 불활성화 하기 위해 10분간 끓는 물에 가열하였고, 10,000×g, 4°C에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 동결 건조하였다. 동결 건조된 시료는 20 mg/mL로 용해시킨 후, 99.5% ethanol과 시료의 비율이 4.1:1(v/v)이 되도록 ethanol을 시료에 첨가하여 12시간 동안 조당을 추출하였다. 조당 추출 후 7500 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하였고, ethanol을 제거하기 위해 상온에서 건조하여 실험에 이용하였다.

분해물의 저분자화를 확인하기 위하여 thin-layer chromatography를 이용하였다. 저 분자화된 sample을 3 µL씩을 silica gel F<sub>254</sub> plate에 spotting 하였고, 1-butanol : methanol : water(4 : 1 : 2 v/v/v) 전개액을 이용하여 전개하였다. 전개 후, 10% 황산첨가 에탄올 용액을 이용하여 분무하였고 이를 110°C 에서 40분간 가열하였다.

Standard mixture는 celooligosaccharide를 사용하였으며, cellobiose, cellotriose, cellotetraose 및 cellohexaose는 Megazyme( Megazyme Co., Wicklow, Ireland)에서, glucose는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2-1-4-2. 염증억제능

#### 세포배양

마우스 유래의 대식세포주인 Raw264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea cell line bank, Seoul, Republic of Korea)에서 분양받았다. 세포 배양을 위해 100 unit/mL penicillin 및 100 unit/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)를 포함하는 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium, Welgene, South Korea)을 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

### Nitric oxide 생성량 측정

미역뿌리와 참모자반의 조효소액 분해물이 세포로부터 생성된 NO에 미치는 영향을 확인하기 위하여 griess 반응을 이용하여 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 양을 측정하였다. DMEM 배지에서 RAW 264.7 세포를 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL의 농도로 24-well plate에 접종하였고, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20시간 전배양하였다. 배양 후 배지를 교환하였고, RAW 264.7 세포에 2 µg/mL의 LPS(SIGMA, St. Louis, MO, USA)를 처리하였다. 이후 참모자반과 미역뿌리의 시간별 조효소액 분해물을 각각 처리하여 24시간 재배양하였다. 이후, 배양액의 상층액을 tube에 옮겨 담고 griess 시약(1% sulfanilamide +0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1 : 1)을 1:1의 비율로 첨가하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 각 세포 배양액의 NO 농도는 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후, 그 값을 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

### Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

세포배양액 중 IL-6, TNF-α 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA-kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. RAW

264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24-well plate에 접종하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 18 시간 전배양하였다. 세포에 미역뿌리와 참모자반 효소분해물 시료를 각각 도포한 후, 2 µg/mL의 LPS를 도포하여 12 시간 재배양하였다. 먼저, ELISA microplate에 capture antibody antimouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β mAb를 분주하여 4°C에서 하룻밤동안 coating하였고, 이를 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline(PBST)로 세척하였다. 이후 10% FBS 용액으로 blocking 하였고 PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 배양 상층액을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 이것을 다시 PBST로 세척한 후, 희석한 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF-α mAb 및 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 microplate에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. IL-1β의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응시킨 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 이를 다시 PBST로 세척한 다음 OPD 용액을 첨가하여 암반응시키고, ELISA reader을 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2-2. 감마선처리

### 2-2-1. 감마선 조사

미역뿌리와 참모자반 분말을 20 mg/mL의 농도로 증류수에 용해한 각 시료에 감마선을 조사하였다. 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에 있는 Co-60 감마선 조사시설(IR-90, Nordin Internation Ltd., Kanata, ON, Canada)을 이용하였고, 실온(14±1°C)에서 시간당 10 kGy로 3, 5, 7, 10 및 20 kGy의 흡수선량이 되도록 조사 하였다. 감마선을 조사한 시료는 4°C 냉장 보관된 상태로 실험에 이용하였다.

## 2-2-2. 감마선분해물의 특성

### 2-2-2-1. pH

2-1-3-1와 동일한 방법으로 측정하였다.

### 2-2-2-2. 색도

색도 측정은 감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 각 시료를 3000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 액체시료용 cell에 취하여 2-1-3-2와 동일한 방법으로 측정하였다. 이용된 표준색판의 값은  $L^*=98.83$ ,  $a^*=0.20$ ,  $b^*=-0.30$ 이었다

### 2-2-2-3. 환원당 및 점도

2-1-3-3와 동일한 방법으로 측정하였다.

## 2-2-3. 산업적 이용 가능성

### 2-2-3-1. 분해물의 저분자화

감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 각 시료의 저분자화를 확인하기 위하여 thin-layer chromatography를 이용하였다. 저 분자화된 각 시료의 상층액을 3  $\mu$ L씩 silica gel F<sub>254</sub> plate에 spotting하고, 1-butanol : methanol : water (4 : 1 : 2 v/v/v) 전개액을 이용하여 전개하였다. 전개 후, 10% 황산첨가 에탄올 용액을 이용하여 분무하였고, 이를 110°C에서 30분간 가열하여 결과를 확인하였다. Standard mixture는 cellooligosaccharide를 사용하였으며 cellobiose, cellotriose, cellotetraose 및 cellohexaose는 Megazyme( Megazyme Co., Wicklow, Ireland)에서,

glucose는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2-2-3-2. 염증억제능

세포배양과 Nitric oxide 생성량 측정 및 Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정은 2-1-4-2과 동일한 방법으로 수행하였다.

### 2-3. 통계처리

실험 결과의 통계처리는 SAS software (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분산분석을 실시하였다. 조사 항목들 간의 유의적 검정은 Duncan 's multiple range test 법에 따라  $P < 0.05$  수준에서 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 효소분해

#### 1-1. 효소분해물의 특성

##### 1-1-1. pH

10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 80 mg/mL 농도로 미역뿌리 시료를 제조하였고, 이 시료를 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 혼합하여 효소분해 하였다. 효소 분해에 최적 온도인 30°C에서 0-48시간 배양한 결과는 Table 2와 같다. pH 8.11(0 h)에서부터 배양시간이 길어질수록 pH값이 유의적으로 감소하였고, 24시간에서 pH 7.00로 가장 낮은 pH 값을 나타내었다. 참모자반 시료는 미역뿌리 시료와 동일하게 실험을 실시하였고, 그 결과는 Table 3와 같다. 0시간 pH 8.04에서 배양시간이 길어질수록 pH의 값이 감소하여 배양시간 24시간에서 pH 7.37로 가장 낮게 나타나, 미역뿌리와 참모자반 시료 모두 배양시간 24시간에서 가장 낮은 pH 값을 보였다. 이것은 Park(2017)의 연구에서 밝힌 바, 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)에 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액을 첨가하여 분해물이 증가할수록 pH가 점점 감소한 결과와 일치한다. 이러한 결과에 따라, 알긴산 분해 효소인 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액을 미역뿌리와 참모자반 각 시료에 첨가함으로써 인해 각 시료의 알긴산이 저분자화된 것을 확인할 수 있었다. 그 외, 배양 시간이 증가함에 따른 미생물의 성장과 오염으로 인한 pH 감소가 원인이 될 수 있지만, 효소분해물 제조 시 미생물의 오염을 방지하기 위하여 sodium azide(0.02%)를 첨가하였기에

미생물 오염으로 인한 pH의 감소 영향은 미미하다고 사료된다.

**Table 2. Changes in of pH enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time**

Time (h)	pH
0	8.11±0.00 <sup>a1)</sup>
3	7.97±0.01 <sup>b</sup>
6	7.87±0.01 <sup>c</sup>
12	7.74±0.01 <sup>d</sup>
24	7.00±0.01 <sup>e</sup>
48	7.06±0.01 <sup>f</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

Table 3. Changes in of pH enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time

Time (h)	pH
0	8.04±0.01 <sup>a1)</sup>
3	7.59±0.01 <sup>b</sup>
6	7.43±0.02 <sup>c</sup>
12	7.40±0.01 <sup>c</sup>
24	7.37±0.01 <sup>c</sup>
48	7.38±0.08 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-d) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

## 1-1-2. 색도

조효소액과 해조류 시료의 반응시간을 달리하여 분해물의 색도를 측정 한 결과는 Table 4, Table 5와 같다. 미역뿌리 분해물의 색도는 배양 0 시간에서 적색도( $a^*$ )와 황색도( $b^*$ )가 각각 5.41, 60.16로 가장 낮았으며, 배양시간이 길어질수록 그 값이 증가하는 경향을 보여 48시간 배양 시 10.22, 75.47로 측정되었다. 명도( $L^*$ )의 경우 배양 0시간에서 55.09였으며, 배양시간이 길어질수록 명도가 감소하여 점점 어두워지는 경향을 보였는데, 24시간에서 조금 증가하다가 48시간에서 다시 감소하였다. 참모자반 분해물의 경우, 배양 0시간에서 적색도( $a^*$ )와 황색도( $b^*$ )가 각각 5.17, 52.50로 가장 낮게 나타났다. 배양시간이 길어질수록 적색도가 증가하는 경향을 보여 3시간 및 6시간에서 9.98로 측정되었고, 그 후에 점점 감소하였으며 48시간에서 8.29임을 확인할 수 있었다. 황색도( $b^*$ )의 경우는 6 시간에서 9.98로 가장 높게 나타났다. 명도( $L^*$ )의 경우, 0시간에서 59.28로 나타났으며 배양시간이 길어질수록 감소하였다. 12시간에서 가장 낮은 값인 39.48로 나타났으며 그 후 증가하여 48시간에서 44.96로 나타났다. 해조류의 색은 주로 엽록소와 카로티노이드계로 특히 갈조류에서는 엽록소 및 푸코잔틴 색소가 많이 함유되어 있어 이들 색소에 의하여 독특한 색을 나타내게 된다. Han 등(1984)의 연구에서는 해조류의 색에 저장조건 또는 가공 등의 물리적 요인이 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 Shin 등(1998)의 연구에서는 건조 또는 가공과정 중 갈변현상 등을 일으켜 전반적으로 어두운 색을 띄게 된다는 것을 보고하였다. 따라서 배양이 끝난 분해물의 색도는 미역뿌리와 참모자반 분말 자체에서 유래되는 색소 성분에 의한 영향이 색도의 변화에 큰 부분으로 작용한다고 사료된다.

**Table 4. Changes in chromaticity of enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time**

Time (h)	L*	a*	b*
0	55.09±0.01 <sup>a1)</sup>	5.41±0.01 <sup>e</sup>	60.16±0.02 <sup>e</sup>
3	38.20±0.04 <sup>b</sup>	8.37±0.15 <sup>d</sup>	63.77±0.27 <sup>d</sup>
6	35.81±0.01 <sup>d</sup>	8.57±0.15 <sup>c</sup>	63.61±0.62 <sup>d</sup>
12	35.30±0.06 <sup>e</sup>	9.09±0.10 <sup>b</sup>	64.52±0.11 <sup>c</sup>
24	36.32±0.03 <sup>c</sup>	10.24±0.08 <sup>a</sup>	69.85±0.04 <sup>b</sup>
48	34.13±0.00 <sup>f</sup>	10.22±0.02 <sup>a</sup>	75.47±1.07 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

**Table 5. Changes in chromaticity of enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time**

Time (h)	L*	a*	b*
0	59.28±0.04 <sup>a1)</sup>	5.17±0.04 <sup>c</sup>	52.50±0.07 <sup>f</sup>
3	43.68±0.02 <sup>c</sup>	9.98±0.05 <sup>a</sup>	63.95±0.15 <sup>a</sup>
6	41.35±0.02 <sup>e</sup>	9.98±0.05 <sup>a</sup>	61.85±0.67 <sup>b</sup>
12	39.48±0.05 <sup>f</sup>	9.92±0.14 <sup>a</sup>	60.60±0.09 <sup>c</sup>
24	43.03±0.11 <sup>c</sup>	8.27±0.12 <sup>b</sup>	57.90±0.17 <sup>e</sup>
48	44.96±0.03 <sup>b</sup>	8.29±0.06 <sup>b</sup>	59.15±0.46 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-e) bearing different superscript in samples

are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 1-1-3. 환원당 및 점도

*Shewanella oneidensis* PKA 1008 균주를 이용하여 조효소액을 제작하였으며 미역뿌리와 참모자반 시료를 각각 혼합한 후 30℃에서 48 시간 배양하였다. 그 후 환원당 및 점도를 측정된 결과(Table 6, Table 7) 미역뿌리와 참모자반 시료의 환원당은 0시간에서 각각 94.82  $\mu\text{g/mL}$ , 84.37  $\mu\text{g/mL}$ 로 환원당 함량이 비교적 낮았고, 배양시간이 길어질수록 그 함량이 유의적으로 증가하였다. 24시간에서 미역뿌리와 참모자반 시료의 환원당 함량은 각각 250.68  $\mu\text{g/mL}$ 와 231.60  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높게 나타났다. 미역뿌리와 참모자반 시료의 점도 변화는 초기 0시간에서 각각 1.31 cP, 1.27 cP였으며, 반응시간이 길어질수록 유의적으로 감소하여 반응 48시간에서 각각 1.13 cP, 1.06 cP로 아주 낮은 점도를 보였다. 이러한 결과는 Alginate를 가열하여 저분자화 할 때, 가열시간이 길어질수록 점도는 급격하게 감소한다는 연구(Kim, 2000)와 Alginate 기질에 알긴산 분해 효소액을 첨가하여 0-60시간 배양하였을 때, 반응시간이 증가할수록 환원당 함량이 증가하고 점도가 감소한다는 연구(Sunwoo et al., 2013) 결과와 일치함을 보였다. 또한 Park(2017)의 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액이 48시간 이후 큰잎모자반에 함유되어 있는 다당류를 가장 효율적으로 분해할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액과 반응한 미역뿌리와 참모자반 추출물 모두 24시간 반응에서 가장 높은 환원당 함량과 낮은 점도를 나타내었다. 이러한 결과에 따라 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액이 미역뿌리와 참모자반에 함유되어 있는 다당류를 저분자화 시킬 수 있는 가장 효율적인 반응시간이 24시간임을 확인할 수 있었으며, 이때 단당과 올리고당이 많이 분해된다는

것을 예상 할 수 있었다.

**Table 6. Changes in reducing sugar assay and viscometry of enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time**

Time (h)	Reducing sugar (µg/mL)	Viscosity (cP)
0	94.82±0.83 <sup>c1)</sup>	1.31±0.02 <sup>a</sup>
3	193.33±1.25 <sup>b</sup>	1.26±0.04 <sup>b</sup>
6	201.69±2.10 <sup>b</sup>	1.25±0.03 <sup>b</sup>
12	202.29±5.45 <sup>b</sup>	1.24±0.02 <sup>b</sup>
24	250.68±1.78 <sup>a</sup>	1.23±0.02 <sup>b</sup>
48	243.73±1.73 <sup>a</sup>	1.13±0.04 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-d) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

**Table 7. Changes in reducing sugar assay and viscometry of enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time**

Time (h)	Reducing sugar (µg/mL)	Viscosity (cP)
0	84.37±4.53e <sup>1)</sup>	1.27±0.01 <sup>a</sup>
3	153.94±0.03 <sup>d</sup>	1.26±0.04 <sup>ab</sup>
6	181.48±0.07 <sup>c</sup>	1.22±0.03 <sup>bc</sup>
12	213.28±0.68 <sup>b</sup>	1.20±0.05 <sup>cd</sup>
24	231.60±1.53 <sup>a</sup>	1.17±0.02 <sup>d</sup>
48	216.19±4.24 <sup>b</sup>	1.06±0.03 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-e) bearing different superscript in samples

are significantly different ( $P<0.05$ ).

## 1-2. 산업적 이용 가능성

### 1-2-1. 분해물의 저분자화

*Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액을 이용한 미역뿌리와 참모자반 각 시료 분해물의 저분자화를 확인하기 위해 thin layer chromatography(TLC) 분석을 이용하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 미역뿌리 시료에 조효소액 추출물을 첨가하였을 때, 반응 0시간에서는 저분자화가 관찰되지 않았다. 반응 3시간 이후 monomer 위치에서 1개의 spot을 관찰할 수 있었고, 해조 다당인 알긴산이 서서히 분해됨을 확인하였다. 최종 반응 48시간까지 spot의 농도가 서서히 짙어지는 것을 관찰할 수 있었고, 반응 48시간에 monosaccharide로 분해됨을 확인하였다(Fig. 2). 참모자반의 경우, 반응 0시간에서는 전개용매에 의한 이동이 나타나지 않았으나, 반응 3시간 이후 2개의 spot을 관찰하였고, 해조 다당인 알긴산이 분해됨을 확인할 수 있었다. 반응 24시간에는 dimer과 monomer로 분해되는 것을 확인하였고, 최종 48시간에서 monosaccharide로 분해됨을 확실히 확인할 수 있었다(Fig. 3). Kim 등 (2015)의 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생성하는 분해 효소가 알긴산을 올리고당 및 단당으로 분해시키고, 반응 48시간 이후부터는 monosaccharide까지 분해됨을 보고하였다. 이 실험의 결과에 따라 해조류 시료에 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액을 처리하여 반응시켰을 때, 미역뿌리 및 참모자반의 다당류가 단당 및 올리고당으로 분해된다는 것을 확인 할 수 있었으며, 이와 더불어 각 시간별 시료들을 이용하여 항염증 실험을 실시하였다.

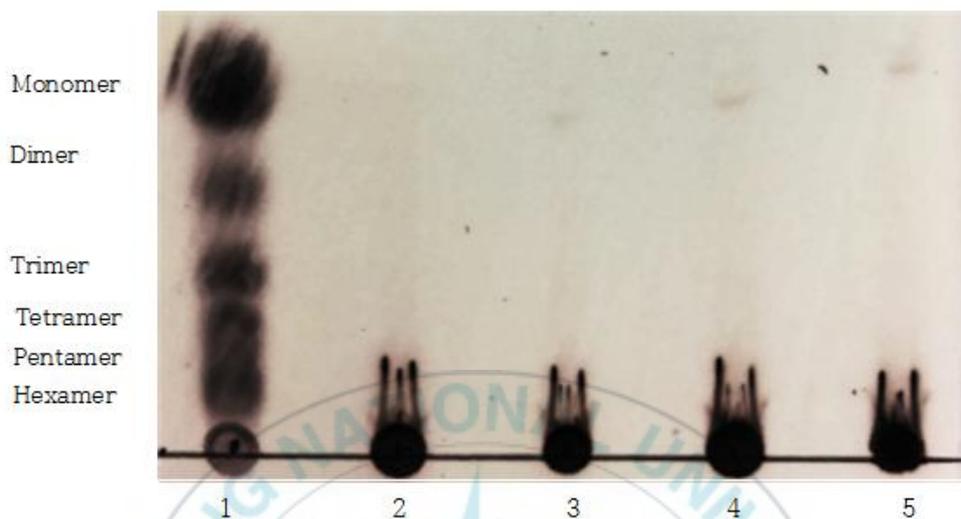


Fig. 2. TLC analysis of alginate hydrolysate of *Undaria pinnatifida* roots by crude alginate degrading enzyme with various incubation time.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 3 h; lane 4, 24 h; lane 5, 48 h.

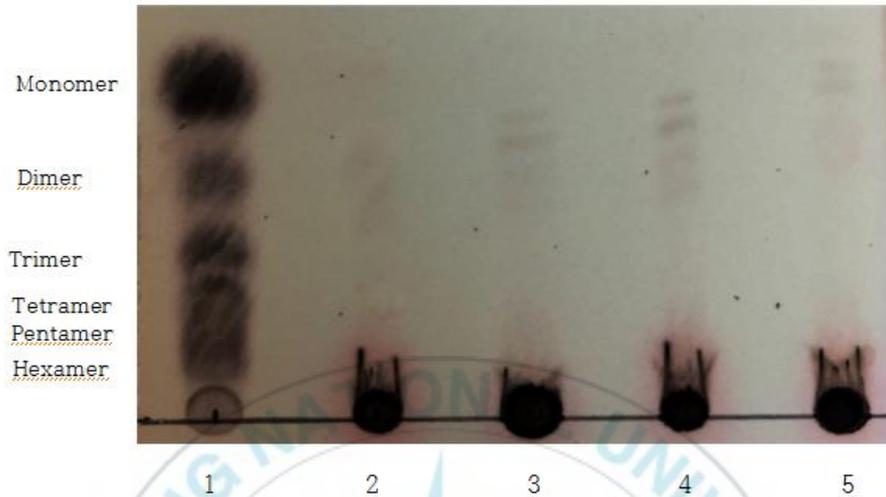


Fig. 3. TLC analysis of alginate hydrolysate of *Sargassum fulvellum* by crude alginate degrading enzyme with various incubation time.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 3 h; lane 4, 24 h; lane 5, 48 h.

## 1-2-2. 항염증 효과

### Nitric oxide 생성량 측정

대식세포는 세균과 같은 항원이 침입할 때 초기 면역반응을 불러오는 세포로서, 이러한 세균을 사멸시키기 위하여 TNF(tumor necrosis factor), IL-1(interleukin 1)등의 여러 가지 물질을 분해하여 염증반응 및 면역반응을 일으킨다. 이 중 nitric oxide(NO)는 생체 내에서 NO synthase(NOS)라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼로써 면역반응, 신경전달, 세포독성 및 혈관확장 등의 생리적인 기능 조절에 중요한 역할을 하는 신호전달 물질이다(Moncada et al.,1991).

본 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액을 처리한 미역뿌리 및 참모자반 각 분해물의 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS로 염증반응을 유도시키고 NO 생성량을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화 시킨 결과, LPS 처리구는 비처리구에 비하여 NO농도가 7배 이상 유의적으로 매우 높아진 것을 확인할 수 있었다. 미역뿌리 시료에 조효소액 처리한 시료군에서는 NO생성이 크게 억제되었는데, 특히 반응 12시간 이후에 크게 억제되었고 48시간에 약 69% 이상 감소함을 보였다. 이를 통해 미역뿌리 시료가 어느 정도 분해된 후, 염증 억제효과가 크게 증진된다는 것을 알 수 있었다. 참모자반의 경우도 효소 반응 이후 NO생성이 크게 억제되었는데, 특히 반응 6시간 처리구에서 79%이상 억제가 되었으며 가장 높은 NO 저해효과를 보였다. 이러한 결과는 Kang 등(2014)의 미역뿌리 에탄올 추출물의 항염증 활성 연구에서 미역뿌리 에탄올 추출물이 세포독성 없이 NO의 생성을 감소시켜 항염증 효과에 기여한다는 보고와 Jeong 등(2012)의 참모자반 물 추출물의 염증 억제 활성 연구에서 참

모자반의 농도가 증가할수록 NO 생성량이 유의성 있게 감소함을 보고한 결과와 일치한다.



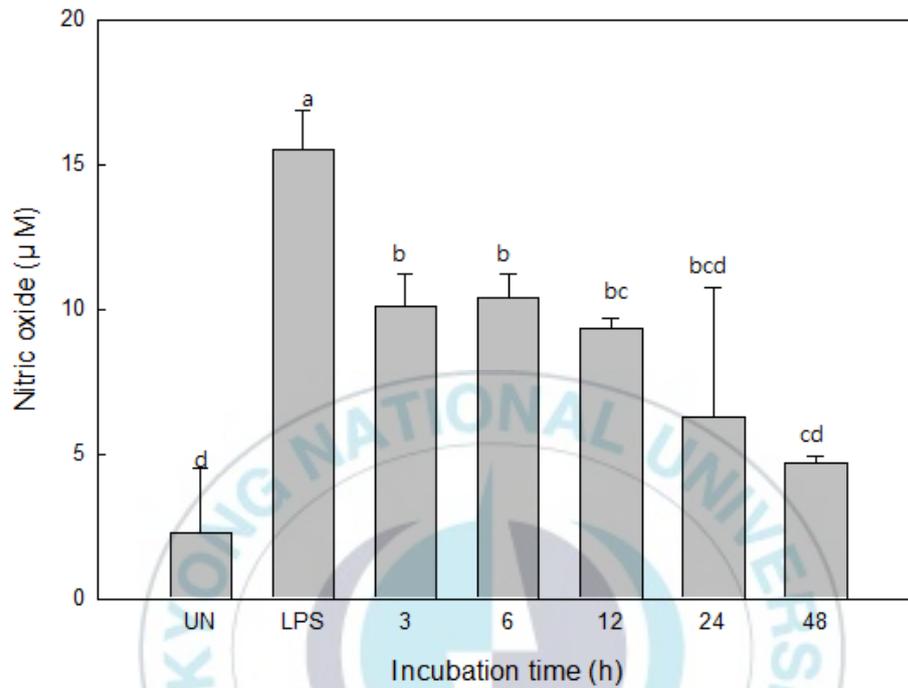


Fig. 4. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time on the production of NO in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

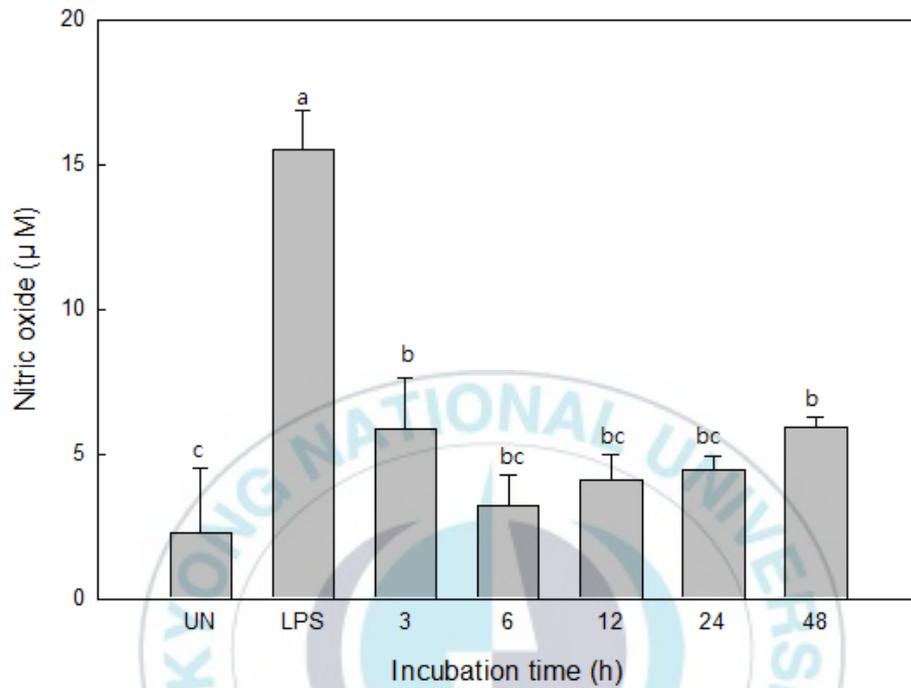


Fig. 5. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time on the production of NO in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 염증 관련 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )의 분비량 변화

대식세포는 LPS와 같은 항원의 자극을 받아 활성화 되면 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  사이토카인 등의 분비를 촉진하여 면역반응을 조절한다(Kim et al., 2015). IL-6는 T세포에서 분비되는 사이토카인이며, 자극에 의한 면역 반응 활성화 등의 역할을 하는 물질이다(Kishimoto et al., 1995; Dienz and Rincon, 2009). TNF- $\alpha$ 는 종양 괴사인자(TNF, Tumor Necrosis Factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴시키는 사이토카인이며, IL-1 $\beta$ 는 국소 염증반응을 일으키며 혈관 내피세포에 작용하여 백혈구의 부착을 매개하거나 표면 분자의 발현을 증가시키는 사이토카인이다(Kim et al., 2013). 본 연구에서는 미역뿌리와 참모자반 조효소 분해물 시료의 염증성 사이토카인 저해 효과를 배양 시간별로 확인하였다. 미역뿌리 조효소 분해물은 배양 0시간에서 IL-6 분비량이 LPS 처리구보다 더 많았고, 배양 3-48 시간에서 IL-6 분비량이 유의적인 감소를 보였으며, 특히 24시간에서는 약 97% 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 참모자반의 경우, IL-6 분비량은 반응 3-48시간에서 약 85% 이상 감소하여 유의적인 저해활성을 보였다(Fig. 7). 또한 미역뿌리 조효소 분해물의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 배양 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였고, 특히 반응 24시간에서 약 85%의 감소효과를 확인할 수 있었다(Fig. 8). 참모자반의 경우도 반응 시간이 경과함에 따라 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 감소하였고, 특히 반응 12시간에서 약 56%의 가장 높은 염증억제효과를 나타내었다(Fig. 9). IL-1 $\beta$  분비량은 미역뿌리와 참모자반 조효소 분해물 두 경우 모두 전반적으로 낮게 나타났다(Fig. 10, Fig. 11). 이는 미역뿌리 에탄올 추출물과 참모자반 물 추출물은 염증성 cytokine인 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  분비를 감소시켜 항염증 효과를 가진다는 연구결과(Kang et al., 2014; Jeong et al., 2012)와 비슷한 결과이다. 미역뿌리와

참모자반 조효소 분해물의 염증성 사이토카인 저해 효과를 보여주는 이러한 결과는 조효소 분해물이 항염증 효과를 증대시키는 물질로 작용할 수 있음을 뒷받침한다. 또한 조효소를 이용하여 저분자화한 해조류 추출물을 항염증성 소재로 개발한다면 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.



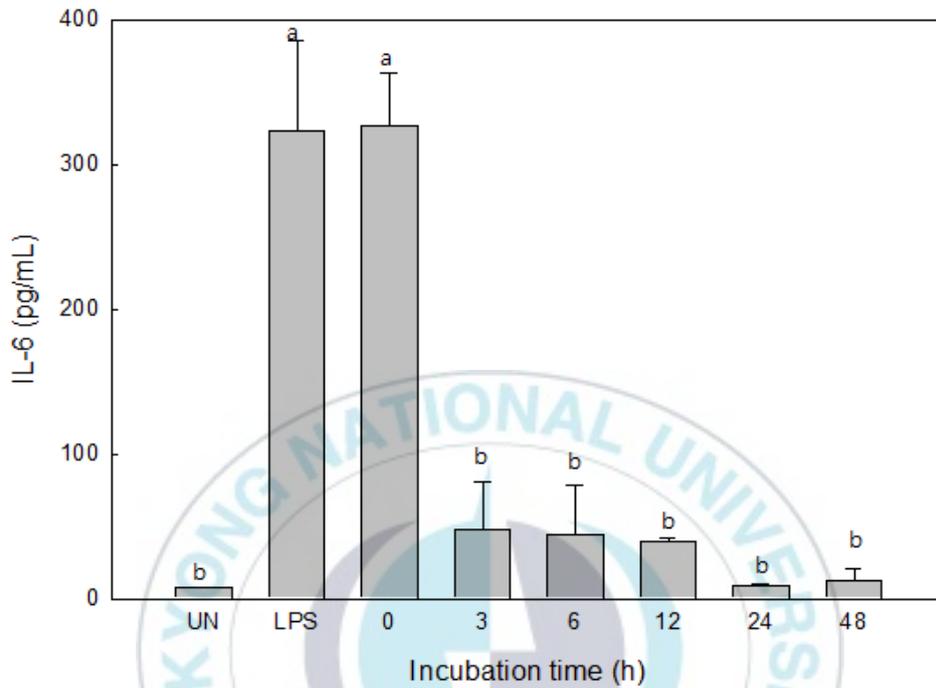


Fig. 6. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

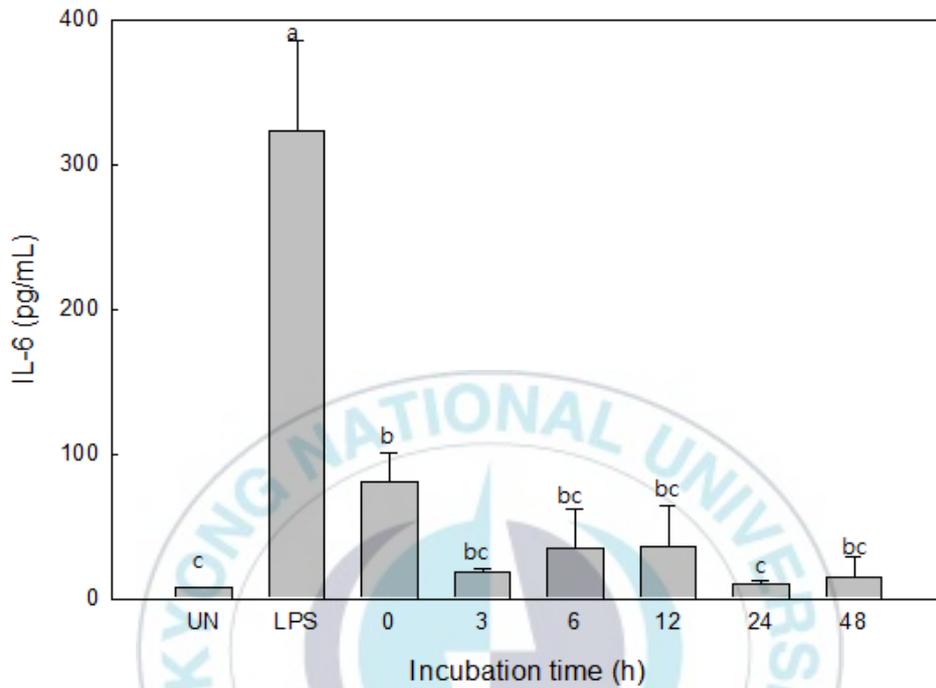


Fig. 7. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

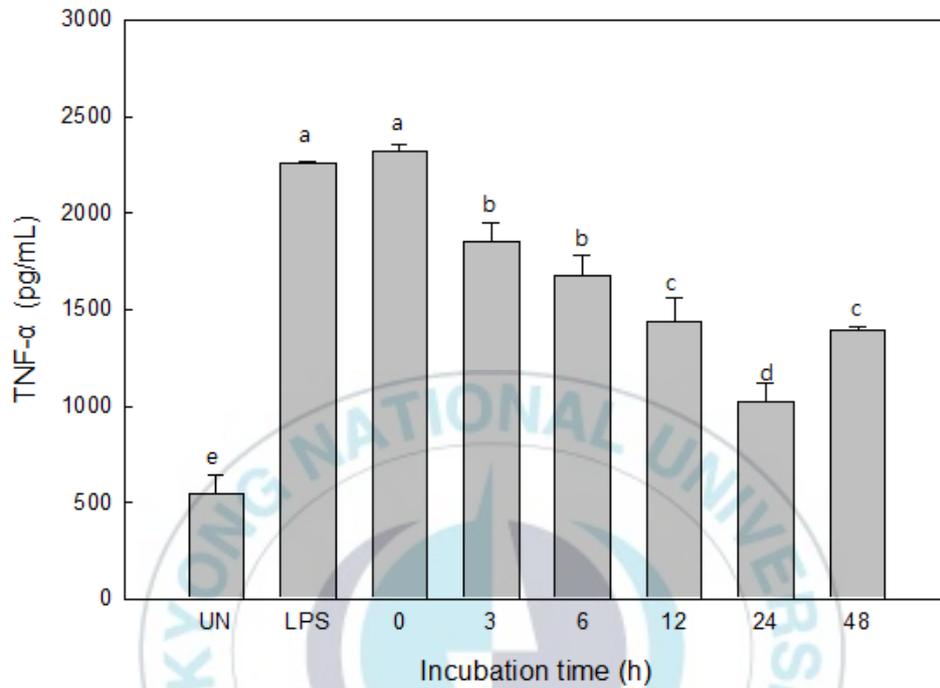


Fig. 8. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time on the production of TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

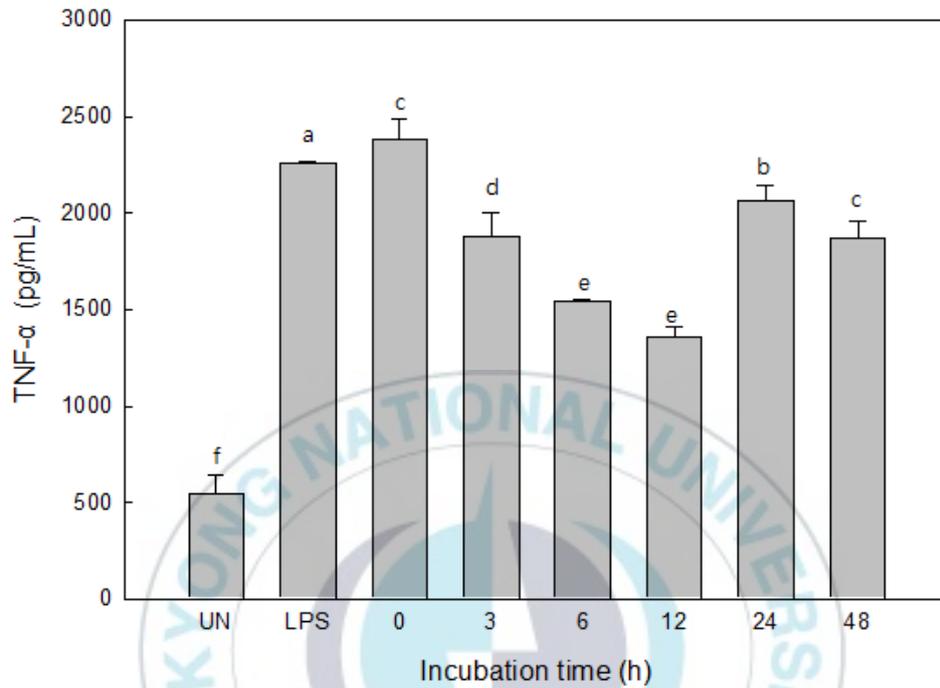


Fig. 9. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time on the production of TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

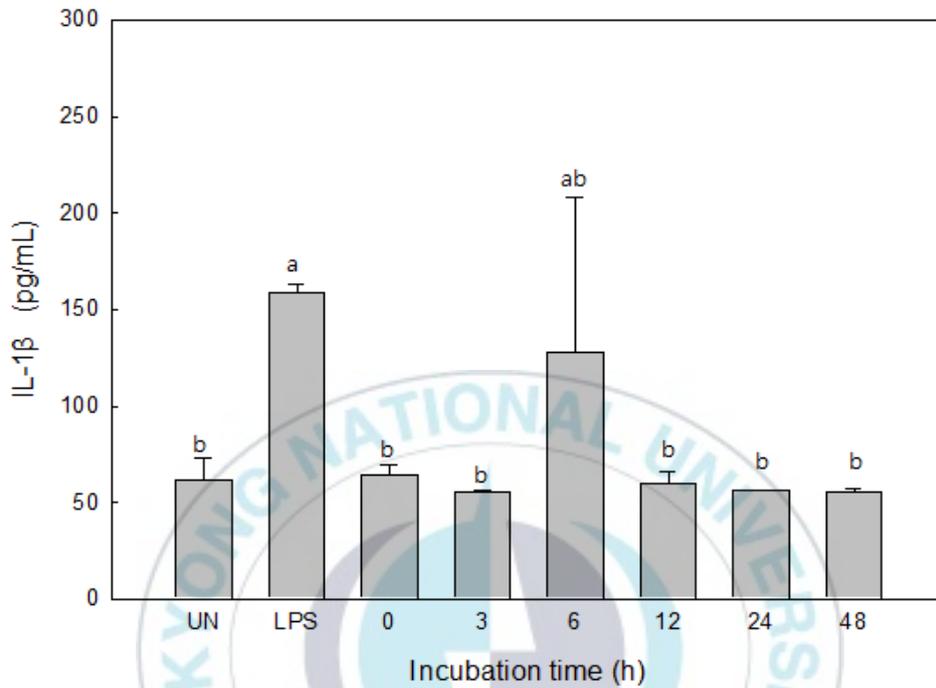


Fig. 10. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Undaria pinnatifida* roots with incubation time on the production of IL-1 $\beta$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

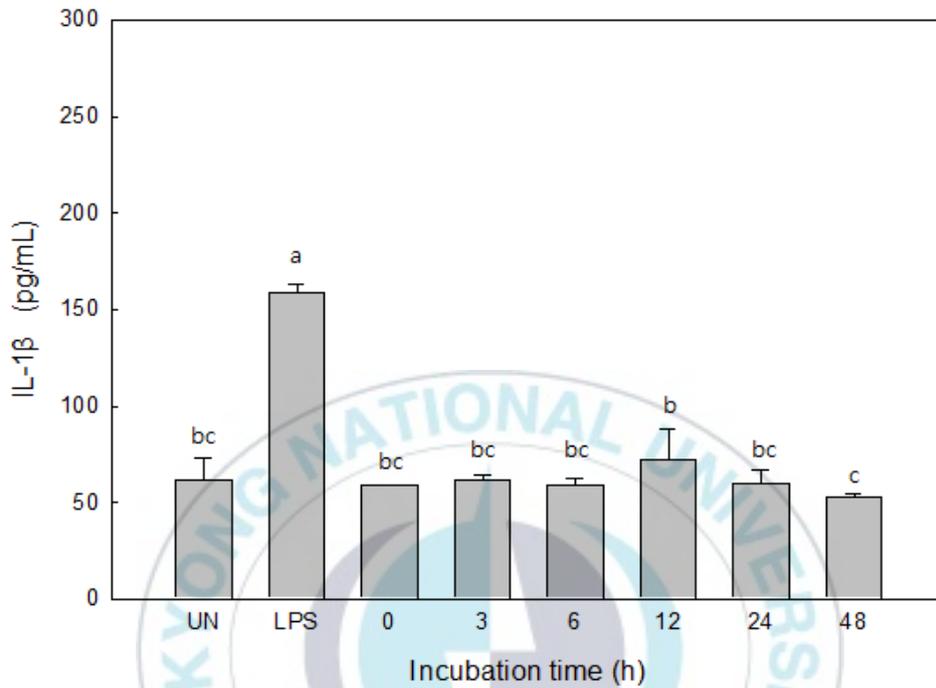


Fig. 11. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum fulvellum* with incubation time on the production of IL-1 $\beta$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 2. 감마선 조사에 의한 저분자화

### 2-1. 감마선분해물 의 특성

#### 2-1-1. pH

3-20 kGy 선량의 감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 분해물의 조사 선량에 따른 pH 변화는 Table 8과 Table 9와 같다. 미역뿌리와 참모자반 분해물의 pH는 각각 약 5.52-5.80, 4.75-4.94의 범위로 나타났으며, 감마선 조사선량에 따른 pH 변화에 유의적인 차이는 없었다. 이는 3-20 kGy 선량의 감마선을 조사한 외톨개 모자반 물 추출물의 pH가 4.98-4.87의 범위로 보고된 Lee 등(2011)의 연구 결과와 유사한 결과이다. 또한 조사선량에 따른 저장 중 양념 갈비의 pH 변화에 유의적인 차이가 없었다고 보고한 Kang 등(2004)의 연구 결과와 일치하였다. 또한 Lee 등(2011)의 연구에서는 감마선 조사한 외톨개 모자반 물 추출물의 pH의 변화가 유의적인 차이를 보이지 않았다. 본 연구결과를 통해 감마선 조사는 미역뿌리와 참모자반 분해물의 pH에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 8. Effect of gamma radiation on the pH in *Undaria pinnatifida* roots

Radiation dose (kGy)	pH
0	5.80±0.02 <sup>a1)</sup>
3	5.65±0.01 <sup>b</sup>
7	5.52±0.01 <sup>d</sup>
10	5.57±0.01 <sup>c</sup>
20	5.66±0.01 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-d) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

Table 9. Effect of gamma radiation on the pH in *Sargassum fulvellum*

Radiation dose (kGy)	pH
0	4.77±0.04 <sup>bc1)</sup>
3	4.75±0.01 <sup>c</sup>
7	4.78±0.01 <sup>bc</sup>
10	4.81±0.01 <sup>bc</sup>
20	4.94±0.01 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-c) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

## 2-1-2. 색도

미역뿌리와 참모자반 분말을 각각 20 mg/mL의 농도로 증류수에 용해하여 만든 수용액에 3-20 kGy 선량의 감마선을 조사한 후, 색차계를 이용하여 명도(L값), 적색도(a값) 및 황색도(b값)를 측정하였다. 그 결과, 비 조사 시 미역뿌리 분해물의 명도(L\*)는 90.04로, 전반적으로 높은 명도 값이 측정되었으며 조사량에 따라 명도의 증감은 있으나 특별한 경향은 관찰되지 않았다. 적색도(a\*)의 경우, 비조사 시 -0.61로 측정되었으며 7 kGy 선량에서 -0.16으로 그 값이 증가하였다. 하지만 10 kGy와 20 kGy 선량에서는 각각 -0.48과 -0.45 값으로 측정되어 적색도가 다시 감소하는 경향을 보였다. 황색도(b\*)는 비 조사 시 11.80로 나타났고 감마선 조사에 의해 증가하는 경향을 보였으며, 특히 7 kGy 선량에서 17.80으로 가장 높은 값으로 확인되었다(Table 10). 참모자반 분해물의 경우 3-20 kGy의 범위에서 감마선 조사선량이 증가함에 따라 적색도와 황색도가 감소하는 경향이 뚜렷이 나타났다. 명도는 3, 7, 10 및 20 kGy 감마선 조사구에서 각각 71.29, 73.43, 72.59 및 76.67로 비 조사구(65.19)에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, 조사선량이 증가함에 따라 명도가 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 감마선 조사에 의해 녹차 내 엽록소와 플라보노이드 색소 성분이 파괴되어 명도는 증가하고 적색도와 황색도는 감소하였다는 결과와 유사하였다(Son et al., 2001).

**Table 10. Effect of gamma radiation on the chromaticity in *Undaria pinnatifida* roots**

Radiation dose (kGy)	L *	a*	b*
0	90.04±0.01 <sup>b1)</sup>	-0.61±0.05 <sup>c</sup>	11.80±0.04 <sup>e</sup>
3	89.75±0.01 <sup>c</sup>	-0.79±0.02 <sup>d</sup>	13.85±0.02 <sup>c</sup>
7	84.64±0.04 <sup>e</sup>	-0.16±0.02 <sup>a</sup>	17.80±0.02 <sup>a</sup>
10	90.94±0.01 <sup>a</sup>	-0.48±0.02 <sup>b</sup>	13.40±0.01 <sup>d</sup>
20	88.02±0.01 <sup>d</sup>	-0.45±0.04 <sup>b</sup>	16.50±0.01 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-e) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

**Table 11. Effect of gamma radiation on the chromaticity in *Sargassum fulvellum***

Radiation dose (kGy)	L *	a*	b*
0	65.19±0.03 <sup>e1)</sup>	7.28±0.07 <sup>a</sup>	64.27±0.03 <sup>a</sup>
3	71.29±0.02 <sup>d</sup>	5.17±0.04 <sup>b</sup>	60.75±0.03 <sup>b</sup>
7	73.43±0.02 <sup>b</sup>	4.62±0.04 <sup>c</sup>	59.87±0.05 <sup>c</sup>
10	72.59±0.01 <sup>c</sup>	4.24±0.04 <sup>d</sup>	58.63±0.02 <sup>d</sup>
20	76.67±0.01 <sup>a</sup>	3.11±0.02 <sup>e</sup>	55.64±0.03 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-e) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

### 2-1-3. 환원당 및 점도

감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 분해물의 환원당 함량은 비조사구에 비해 눈에 띄게 증가하는 경향을 보였다. 감마선을 조사하지 않은 미역뿌리 분해물의 환원당 함량은 134.91  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되었으나, 감마선을 조사한 미역뿌리 분해물의 환원당 함량은 비조사구에 비해 증가하였으며, 특히 조사선량이 증가함에 따라 환원당 함량도 증가하는 추세를 보여 20 kGy 조사 시 가장 높게 나타났다. 참모자반 분해물의 경우, 감마선 조사선량이 증가할수록 환원당 함량이 유의적으로 증가하였고, 20 kGy 조사 시 가장 높은 값인 283.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타냈다. 미역뿌리와 참모자반 분해물의 점도는 비 조사의 경우, 각각 1.26 cP, 1.21 cP였으며 감마선 조사선량이 증가함에 따라 분해물의 점도가 감소하여 최종적으로 20 kGy 조사에서 각각 0.91 cP, 0.83 cP로 점도가 가장 낮음을 확인할 수 있었다. Song 등(2008)의 연구에서는 알긴산을 감마선 조사하여 저분자화 하였을 때, 감마선 선량이 증가 할수록 점도와 분자량이 감소하는 것은 점도와 분자량 사이에 서로 유의적인 상관관계가 있기 때문이라고 보고하였다. 또한 고선량의 감마선 조사에 의해 구성 다당류가 소당류 및 단당류로 분해됨에 따라 환원당이 증가할 가능성이 있다고 보고 하였다(Elias et al., 1977). Noh등(2001)의 연구에서는 팔과 녹두의 수침 용출액을 1-30 kGy 선량범위에서 감마선을 조사하였을 때 조사선량의 증가에 따라 환원당 함량이 유의적으로 증가됨을 보고하기도 하였다. 이러한 결과와 마찬가지로 본 연구에서는 미역뿌리와 참모자반 분말을 용해하여 만들어진 각 수용액에 물리적인 방법인 감마선을 조사하여 미역뿌리와 참모자반에 함유되어있는 다당류를 저분자화 시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

**Table 12. Effect of gamma radiation on the reducing sugar assay and viscometry in *Undaria pinnatifida* root**

Radiation dose (kGy)	Reducing sugar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Viscosity (cP)
0	134.91 $\pm$ 0.05 <sup>e1)</sup>	1.26 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
3	223.48 $\pm$ 1.27 <sup>d</sup>	1.05 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
7	268.68 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
10	240.92 $\pm$ 0.30 <sup>c</sup>	0.96 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
20	283.40 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-e) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

**Table 13. Effect of gamma radiation on the reducing sugar assay and viscometry in *Sargassum fulvellum***

Radiation dose (kGy)	Reducing sugar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Viscosity (cP)
0	279.01 $\pm$ 2.08 <sup>e1)</sup>	1.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
3	360.16 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	1.04 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
7	413.97 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup>	0.95 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
10	471.51 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>	0.90 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
20	528.16 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a-e) bearing different superscript in samples are significantly different ( $P<0.05$ ).

## 2-2. 산업적 이용 가능성

### 2-2-1. 분해물의 저분자화

감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 분해물의 저분자화를 확인하기 위하여 TLC 분석을 이용하였으며, 그 결과는 Fig. 12와 Fig. 13에 나타내었다. 감마선을 처리하지 않는 미역뿌리 시료는 저분자화 되지 않았고, 3 kGy 조사 시 1개 spot을 관찰함을 통해 해조 다당인 알긴산이 서서히 분해됨을 확인하였다. 또한 최고 20 kGy 조사 시 monosaccharide로 분해됨을 확인하였다(Fig. 12). 참모자반의 경우, 감마선을 비처리 시 저분자화를 확인할 수 없었고, 3 kGy 이상의 조사량에서 1개 spot을 관찰하여 monomer로 분해되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 13). Cho 등(2003)의 연구에서는 10 kGy의 선량으로 조사 할 경우, 알긴산이 급격하게 분해된다고 보고하였다. 또한 Wasikiewicz 등(2005)의 연구에서는 감마선을 조사함으로써 glycosidic bonds가 파괴되어 알긴산나트륨을 분해할 수 있다고 보고하였다. 효소분해를 이용한 저분자화 방법은 분해 속도가 느리고 비용이 많이 드는 단점이 있어 산업적 이용에 적합하지 않다(Aiba, 1994; Choi et al., 2002). 하지만 방사 해중합 기술(Irradiation depolymerization technique)을 이용하여 alginate oligomers와 monomers를 대량 생산한다면 산업적으로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대하였다(Nagasawa et al., 2000; Hien et al., 2000). 이에 본 연구에서는 미역뿌리와 참모자반에 함유되어 있는 다당류가 감마선 조사를 통해 단당 및 올리고당으로 저분자화 되는 결과를 도출하였고, 방사 해중합 기술의 산업적 이용 가능성을 확인할 수 있었다. 이어서 감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 분해물의 효능 및 효과에 대한 검증을 위하여 염증관련 인자(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )에 대한 항염증 효과 연구를 진행하였다.

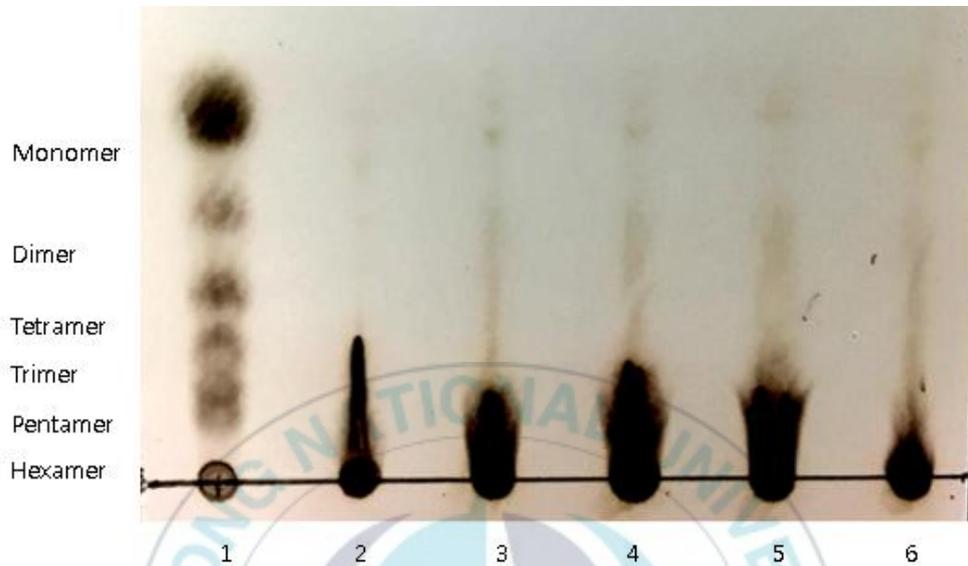


Fig. 12. TLC analysis of alginate degradation of *Undaria pinnatifida* roots by gamma irradiated-treatment with various radiation dose.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 kGy; lane 3, 3 kGy; lane 4, 7 kGy; lane 5, 10 kGy; lane 6, 20 kGy.

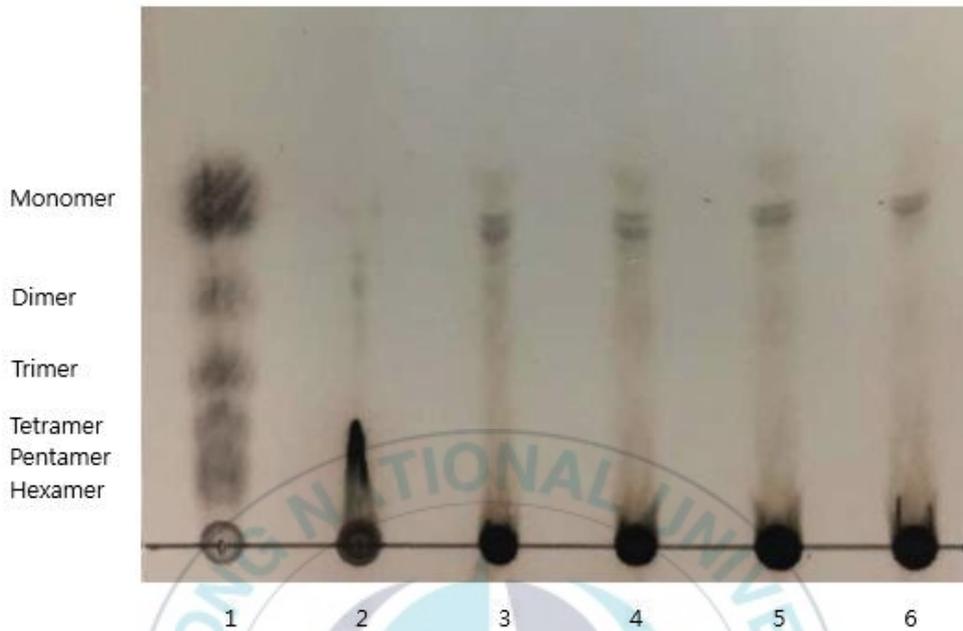


Fig. 13. TLC analysis of alginate degradation of *Sargassum fulvellum* by gamma irradiated-treatment with various radiation dose.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 kGy; lane 3, 3 kGy; lane 4, 7 kGy; lane 5, 10 kGy; lane 6, 20 kGy.

## 2-2-2. 항염증 효과

### Nitric oxide 생성량 측정

NO reduction assay는 대식세포의 중요한 기능 중의 하나인 식세포 작용(phagocytosis)과 관련된 간접적인 활성 측정의 한 방법으로 대식세포가 그 활동을 얼마나 활발하게 하고 있는지를 알아보는 시험이다(Jang et al., 2011). 본 연구에서는 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화시켜 NO 생성을 유도하였다. 이 후 감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 시료를 처리하여 NO 생성 저해 활성 실험을 실시하였다. 그 결과, 감마선을 조사한 미역뿌리의 NO 생성 억제효과를 확인할 수 있었다(Fig. 14). 특히, 3 kGy 조사되었을 때 약 50%의 NO 생성 억제효과를 보였다. 참모자반의 경우, NO 생성량이 약 4배 이상 낮아졌으며 특히 20 kGy 선량으로 조사한 경우, NO 생성이 약 87% 감소되는 것으로 확인되었다(Fig. 15). Jeong 등(2012)의 참모자반 물 추출물의 염증 억제 활성에 대한 연구에서는 참모자반 물 추출물이 NO 생성을 저해한다는 것을 보고하였다. 또한 Lee 등(2011)의 연구에서는 외톨개모자반의 추출물에 감마선을 조사한 뒤 면역 활성이 더 증가하였다고 보고하였다. 따라서 감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 시료는 감마선을 조사하지 않은 시료보다 염증억제에 높은 효과가 있을 것으로 사료된다.

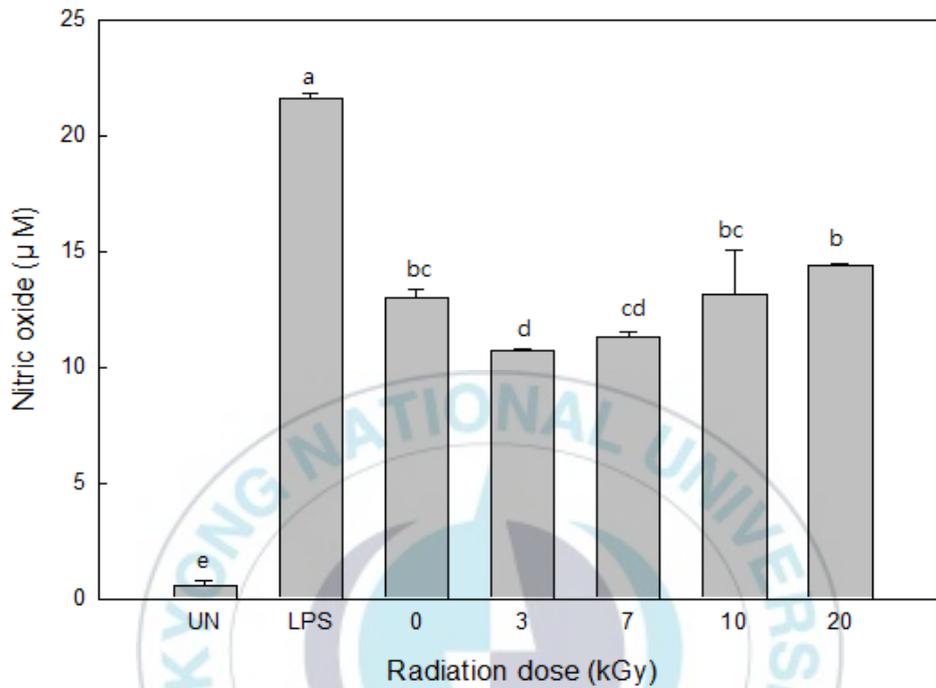


Fig. 14. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Undaria pinnatifida* roots with various radiation dose on the production of NO in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

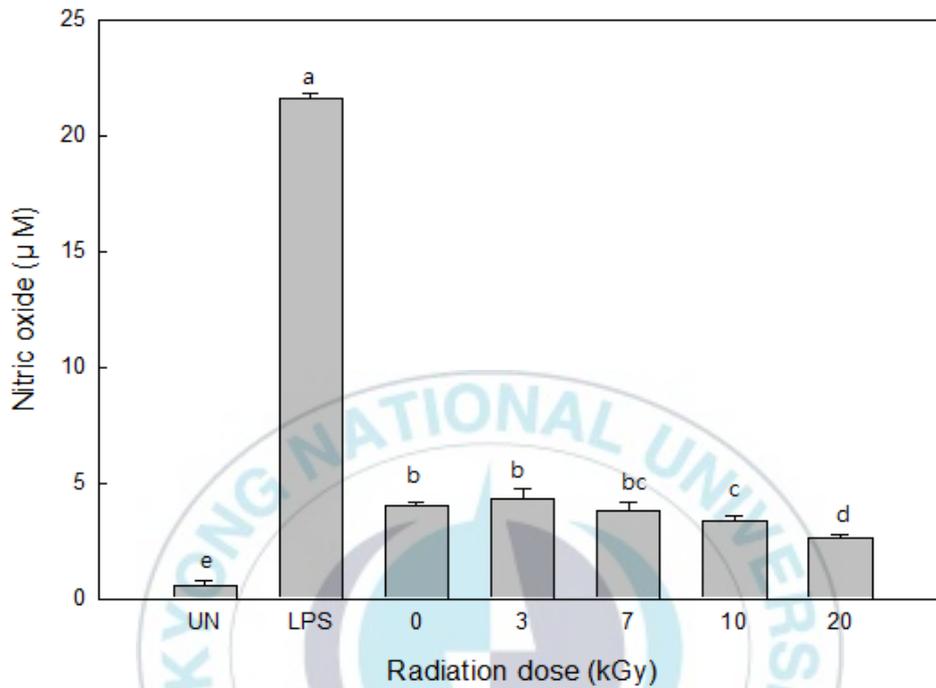


Fig. 15. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Sargassum fulvellum* with various radiation dose on the production of NO in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 염증 관련 사이토카인(IL-6 ,TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )의 분비량 변화

감마선을 조사한 미역뿌리와 참모자반 분해물이 대식세포에서 LPS 처리에 의한 염증반응으로 유도된 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 확인하였다. 미역뿌리의 경우, 3-20 kGy 조사구가 비조사구에 비해 IL-6의 분비량이 감소하는 것으로 나타났고, 특히 3 kGy 선량에서 IL-6 분비가 약 46% 감소하여 염증 억제효과가 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 16). 참모자반의 경우에도 3-20 kGy 조사구는 IL-6의 분비량이 약 97% 이상 감소하여 염증 억제효과가 매우 뛰어난 것으로 나타났다(Fig. 17). 또한 3-20 kGy 선량으로 조사된 미역뿌리와 참모자반 시료 모두 비조사구에 비해 TNF- $\alpha$ 의 억제 효과가 더 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 18, Fig. 19). 특히 감마선을 조사한 참모자반 시료의 경우, 3 kGy 선량에서 38%의 염증억제효과를 나타내었다. 그러나 IL-1 $\beta$ 의 경우는 미역뿌리와 참모자반 시료 모두 조사구별로 변이가 심하여 일정한 경향을 나타내지 않았다(Fig. 20, Fig. 21). 해조류의 추출물에는 fucoidan, laminaran 및 carageenan 같은 다당류가 함유되어 있어 면역체계에 영향을 준다고 알려져 있다(Jung et al., 2002). 또는 Lee 등(2011)의 연구에서는 갈조류인 외톨개 모자반 물 추출물을 감마선 조사하여 면역반응을 활성화 할 수 있다고 보고하였다. 이러한 결과에 따라 감마선 조사에 의한 해조류 다당류의 저분자화가 항염증 기능의 활성화에 영향을 미치는 것으로 판단되어진다.

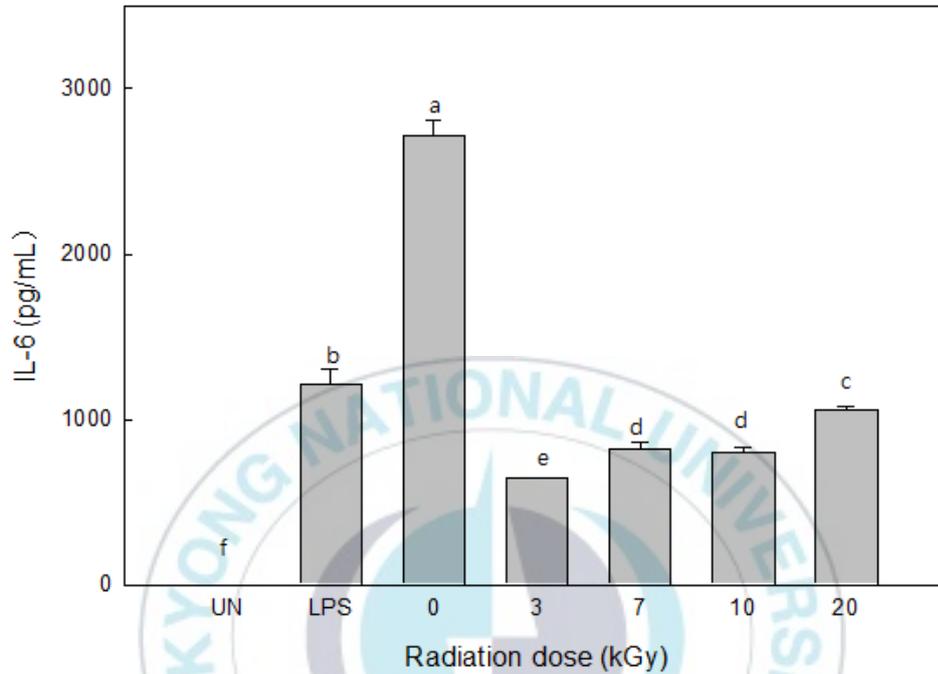


Fig. 16. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Undaria pinnatifida* roots with various radiation dose on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

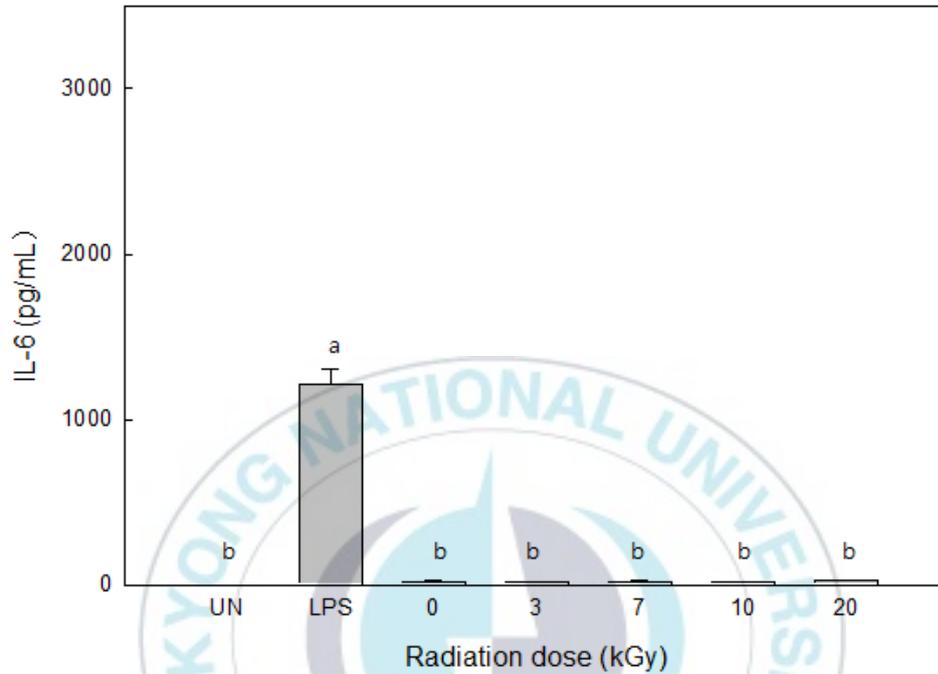


Fig. 17. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Sargassum fulvellum* with various radiation dose on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

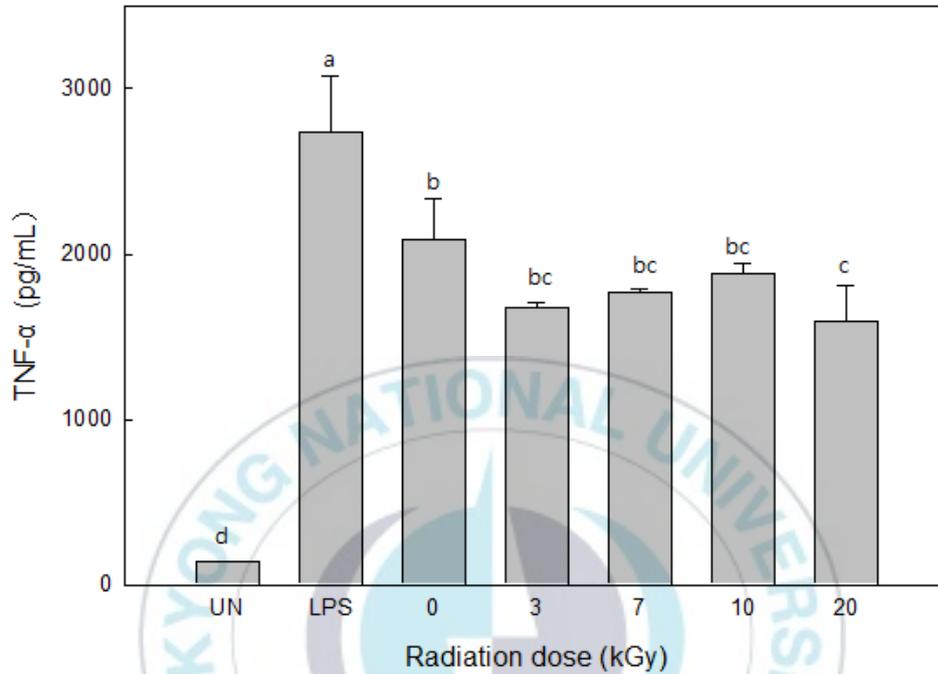


Fig. 18. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Undaria pinnatifida* roots with various radiation on the production of TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

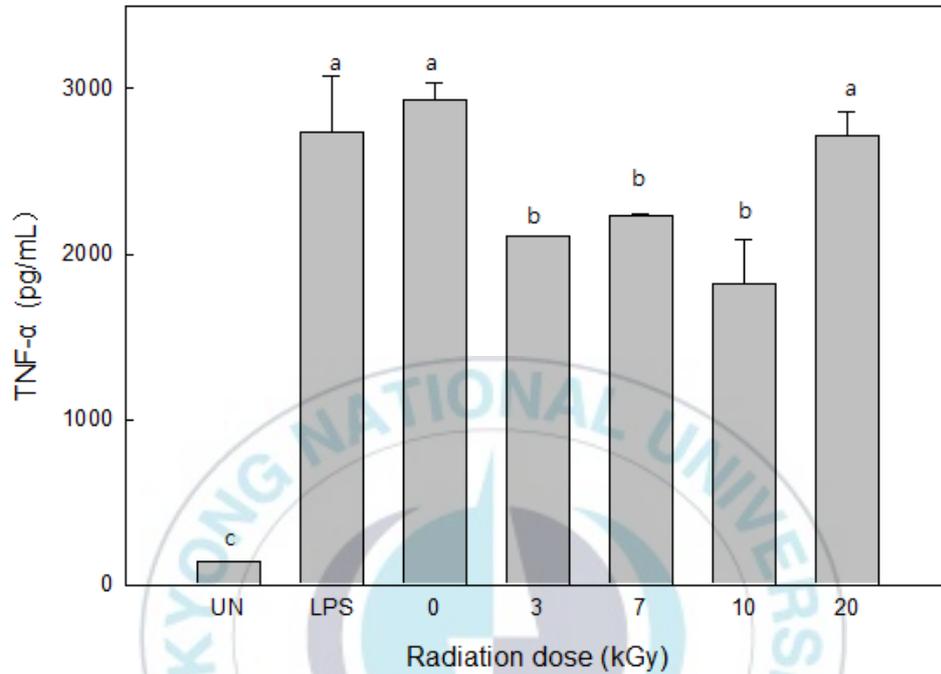


Fig. 19. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Sargassum fulvellum* with various radiation on the production of TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

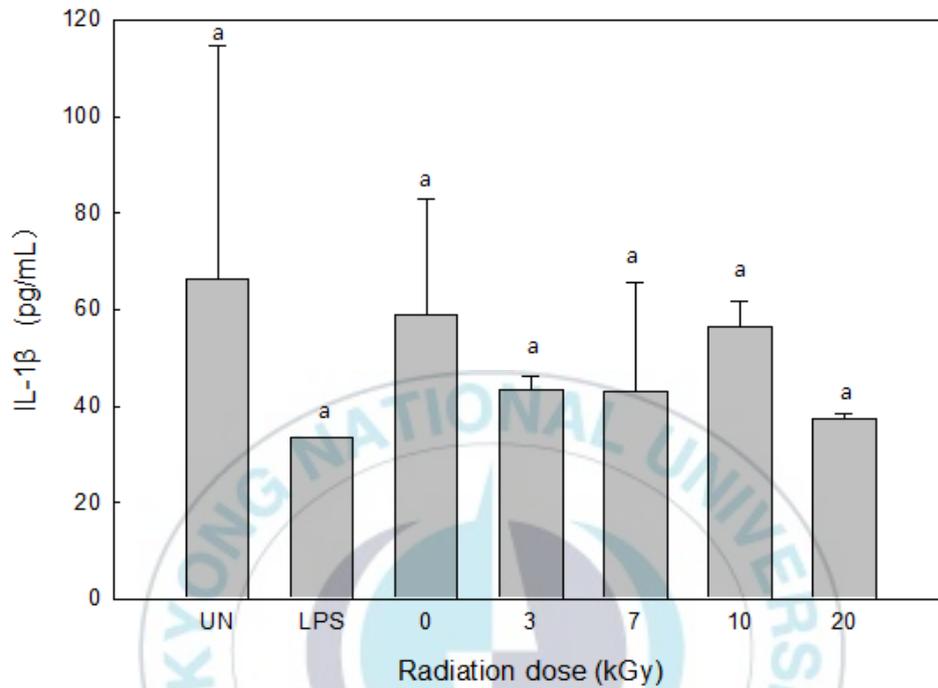


Fig. 20. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Undaria pinnatifida* roots with various radiation on the production of IL-1 $\beta$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

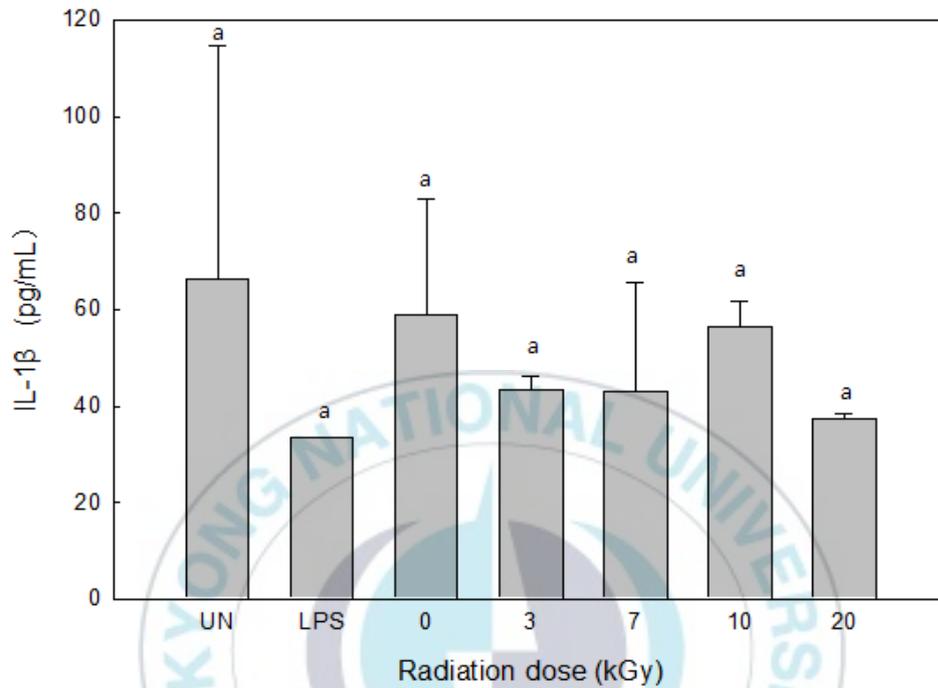


Fig. 21. Inhibitory effect of extracts from gamma-irradiated *Sargassum fulvellum* with various radiation on the production of IL-1 $\beta$  in RAW 264.7 cells.

Means with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 요 약

미역뿌리와 참모자반에 함유되어 있는 다당류를 저분자화하기 위해 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 효소 처리와 감마선 조사를 각각 진행하였다. 또한 저분자화 된 추출물로부터의 일반특성 및 기능적 특성 변화를 확인하였다.

### 1. 효소에 의한 저분자화

#### 1-1. 효소분해물의 특성

1-1-1. 미역뿌리 조효소 분해물의 pH를 확인한 결과, 0시간(pH 8.11)에서부터 배양시간이 길어질수록 pH 값이 유의적으로 감소하였고, 24시간에서 pH 7.00로 가장 낮은 pH값을 나타내었다. 참모자반 조효소 분해물의 경우, 0시간(pH 8.04)에서 배양시간이 길어질수록 pH 값이 감소하여 배양시간 24시간에서 pH 7.37로 낮은 pH 값을 확인할 수 있었다.

1-1-2. 미역뿌리 조효소 분해물의 색도측정 결과, 명도(L\*)는 배양 48시간에서 34.13으로 가장 낮은 측정값으로 나타났고, 적색도(a\*)와 황색도(b\*)는 0시간에서 각각 5.41과 60.16로 가장 낮은 측정값을 보였다. 참모자반의 경우, 명도(L\*)는 12시간에서 39.48로 가장 낮은 측정값으로 나타났고, 적색도(a\*)와 황색도(b\*)는 0시간에서 각각 5.17과 52.50으로 가장 낮은 측정값으로 확인되었다.

1-1-3. 미역뿌리와 참모자반의 환원당은 배양 시간이 길어질수록 그 함량이 유의적으로 증가하였다. 배양 24시간에서 미역뿌리와 참모자반의 환원당 함량은 각각 250.68  $\mu\text{g/mL}$ , 231.60  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높게 나타났

다. 미역뿌리와 참모자반의 점도 변화는 배양 시간이 길어질수록 유의적으로 감소하여, 배양 48시간에서 각각 1.13 cP, 1.06 cP로 아주 낮은 점도를 보였다.

## 1-2. 산업적 이용 가능성

1-2-1. 미역뿌리 조효소 분해물은 반응 24시간 이후 저분자화 되었으며, 반응 48시간까지는 monosaccharide로 분해됨을 확인하였다. 참모자반 조효소 분해물의 경우, 반응 24 시간까지는 dimer과 monomer로 분해되는 것을 확인할 수 있다.

1-2-2. Nitric oxide 생성량 측정 결과, 미역뿌리 시료에 조효소액을 반응시킨 경우 NO생성이 크게 억제되었는데, 특히 반응 12시간 이후에 크게 억제되었고 48시간에 약 69% 이상 감소함을 보였다. 이를 통해 미역뿌리 추출물이 조효소액에 의해 어느 정도 분해되었을 때, 염증 억제 효과가 크게 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 참모자반의 경우도 효소 반응 이후 NO생성이 크게 억제되었는데, 특히 반응 6시간에서 약 79% 이상 억제가 되었으며 가장 높은 NO 저해효과를 보였다.

염증매개 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )의 분비량을 측정한 결과, 미역뿌리 조효소 분해물은 배양 3-48시간에서 IL-6 분비량이 유의적으로 감소하였으며, 특히 24시간에서는 약 97% 감소하는 것으로 나타났다. 참모자반 경우, IL-6 분비량은 반응 3-48시간에서 약 85% 이상 감소하여 유의적인 저해활성을 보였다. 또한 미역뿌리 조효소 분해물의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 반응 24시간에서 약 85%의 감소효과를 확인할 수 있었다. 참모자반의 경우도 반응 12시간에서 약 56%의 가장 높은 염증억제효과를 나타내었다. IL-1 $\beta$  분비량은 미역뿌리와 참모자반 조효소 분해물 두 경우 모두 전반적으로 낮게 나타났다.

이에 따라 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 조효소에 의한 미역뿌리와 참모자반 효소적 추출 분해물은 염증에 관여하는 NO와 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 발현을 억제하는데 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 2. 감마선 조사에 의한 저분자화

### 2-1. 감마선분해물의 특성

2-1-1. 감마선 조사선량(3-20 kGy)에 따른 미역뿌리 및 참모자반 분해물의 pH 변화를 확인한 결과, 그 변화가 미미한 것을 확인할 수 있었다.

2-1-2. 미역뿌리 분해물의 명도(L\*)는 감마선 비조사 시 90.04로 나타나 전반적으로 명도가 높게 나타났으며, 조사량에 따라 명도의 증감은 있으나 특별한 경향을 보이지는 않았다. 적색도(a\*)의 경우, 비조사 시 -0.61로 측정되었으며 7 kGy 조사선량에서 -0.16으로 그 값이 증가하였다. 하지만 10과 20 kGy 조사선량에서는 각각 -0.48과 -0.45 값으로 측정되어 적색도가 다시 감소하는 경향을 보였다. 황색도(b\*)는 감마선 비조사 시 11.80으로 측정되었으며, 감마선 조사에 의해 그 값이 증가하는 경향을 보였다. 특히 7 kGy 조사선량에서 17.80으로 가장 높은 황색도 값을 나타내었다. 참모자반 분해물의 경우, 조사선량이 증가함에 따라 적색도와 황색도가 감소하는 경향이 뚜렷이 나타났다. 명도는 3, 7, 10 및 20 kGy 감마선 조사 시 비조사구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다.

2-1-3. 환원당 및 점도를 측정된 결과, 미역뿌리와 참모자반 분해물의 환원당은 20 kGy 조사 시 각각 283.40  $\mu\text{g/mL}$ 와 283.40  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 값을 보였다. 또한 감마선 조사선량이 증가함에 따라 미역뿌리와

참모자반 분해물의 점도는 감소하여 최종적으로 20 kGy 조사선량에서 각각 0.91 cP와 0.83 cP로 가장 낮은 점도값을 나타내었다.

## 2-2. 산업적 이용 가능성

2-2-1. 감마선 조사선량(3-20 kGy)에 따른 미역뿌리 및 참모자반 분해물의 저분자화를 TLC를 통해 확인한 결과, 감마선을 조사하지 않는 미역뿌리와 참모자반 각 시료에서는 저분자화를 확인할 수 없었고, 3 kGy 조사선량에서 부터 분해되기 시작하여 최종 20 kGy 조사선량에서 monosaccharide로 분해됨을 확인하였다.

2-2-2. 감마선을 조사한 미역뿌리 시료의 NO 생성 억제효과를 확인한 결과, 3 kGy 조사 시 50%의 NO 생성 억제 효과를 보였다. 참모자반의 경우, 20 kGy 선량으로 조사 시 약 87% 감소되는 것으로 확인되었다. 염증 매개 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )의 분비량을 측정된 결과 미역뿌리의 경우, 3 kGy 조사 시 IL-6 분비가 약 46% 감소하여 염증 억제효과가 가장 높은 것으로 확인되었다. 참모자반의 경우에도 3-20 kGy 조사구가 IL-6의 분비량이 약 97%이상 감소하여 염증 억제효과가 매우 높게 나타났다. 또한 3-20 kGy 선량으로 조사된 미역뿌리와 참모자반 시료 모두 TNF- $\alpha$ 의 억제 효과가 더 증가하는 경향을 보였다. 그러나 IL-1 $\beta$ 의 경우, 조사구 별로 변이가 심하여 일정한 경향을 나타내지 않았다.

이에 따라 감마선 조사에 의한 미역뿌리와 참모자반 분해물은 염증에 관여하는 NO와 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) 발현을 억제하는데 효과가 있는 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

Aiba, S. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation. Carbohydr. Res. 265, 323-328.

An, B. J., Lee, J. T. 2000. An application and the natural stabilizer in the food industry. Food Industry and Nutrition.. 5, 57-61.

Byun, E. H., Kim, J. H., Sung, N. Y., Choi, J. I., Lim, S. T., Kim, K. H., Yook, H. S., Byun, M. W., Lee, J. W. 2008. Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of  $\beta$ -glucan. Radiation Physics and Chemistry. 77, 781-786.

Cha, M. H., Kim, Y. K. 2008. Analysis of consumption values of a seaweed functional food. Korean J. Food Culture. 23, 462-468.

Choi, H. S., Kim, S. S., Kim, J. G., Kim W. J. 1992. Effect of temperature on some quality characteristics of aqueous extracts of sea mustard. Korea J. Food Sci. Technol. 18, 474-481.

Choi, J. I., Kim, H. J., Lee, J. W. 2011. Structural feature and antioxidant activity of low molecular weight laminarin degraded by gamma irradiation. Food Chemistry. 129, 520-523.

Choi, J. I., Kim, H. J. 2013. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity. Carbohydrate Polymers. 97, 358-362.

Choi, W. S., Ahn, K. J., Lee, D. W., Byun, M. W., Park, H. J. 2002. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. Polym. Degrad. Stab. 78, 533 - 538.

Cho, M., Kim, B. Y., Rhim, J. H. 2003. Degradation of alginate solution by using  $\gamma$ -irradiation and organic acid. Korean J. Food Sci. Technol. 35, 67-71.

Dienz, O., Rincon, M. 2009. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. Clin. Immunol. 130, 27-33.

Dauphin, J.F., Saint-Lebe, L.R., 1977. Radiation chemistry of carbohydrates. In: Elias, P.S., Cohen, A.J. Radiation chemistry of major food components. Elsevier Scientific, Amsterdam, pp. 131 - 220.

Han, B. H., Bae, T. J., Kim, B. S. 1984. Stability of chlorophyll during processing and storage of salted *Undaria pinnatifida*. Korean J. Food Sci. Technol. 16, 71-77.

Hien, N. Q., Nagasawa, N., Tham, L. X., Yoshii, F., Dang, V. H., Mitomo, H., Makuuchi, K., Kume, T. 2000. Growth-promotion of

plants with depolymerized alginates by irradiation. Radiat. Phys. Chem. 59, 97-101.

Jang, J. R., Hwang, Y. H., Lim, S. Y. 2011. Inhibitory effect of extracts of platycodon grandiflorum (*the Ballon flower*) on oxidation and nitric oxide Production. Korean J. Food Preserv. 18, 65-71.

Jeong, D. H., Kim, K. B. W. R., Kang, B. K., Jung, S. A., Kim, H. J., Jeong, H. Y., Bark, S. W., Ahn, D. H. 2012. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Sargassum fulvellum*. Korean Soc. Biotechnol Bioeng J. 27, 325-329.

Jung, K. J., Jung, B. M., Kim, S. B. 2002. Effect of Pophyran isolated from laver, *Porphyra yezoensis* on liver lipid peroxidation in hyperlipidemic rats and on immunological functions on mice. Korean J. Food Sci Technol 34, 325-329.

Kang, B. K., Ahn, N. K., Choi, Y. U., Kim, M. J., Bark, S. W., Pak, W. M., Kim, B. R., Kim. K. B. W. R., Ahn, D. H. 2014. Anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Undaria pinnatifida* root in RAW 264.7 cells. Korean J. Fish Aquat. Sci. 47, 751-756.

Kang, H. J., Jo, C. R., Lee, N. Y., Kim, J. O., Byung, M. W. 2004. Effect of gamma irradiation on microbial growth, electron donating ability, and lipid oxidation of marinated beef rib (Galbi) with different

packaging methods. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33, 888-893.

Kim, J. H., Kim, Y. H., Kim, S. K., Kim, Y. O., Ju, J. Y., Shin, C. S. 2007. Development of lipase inhibitors from various derivatives of monascus pigment produced by *Monascus* fermentation. Food. Chem. 101, 357-364.

Kim, I. K., Yun, Y. C., Shin, Y. C., Yoo, J. Y. 2013. Effect of *Sparassis crispa* extracts on immune cell activation and tumor growth inhibition. J. Life Sci. 23, 984-988.

Kim, M. J., Bae, N. Y., Bark, S. W., Kim, K. B. W. R., Park, J. H., Park, S. H., Ahn, D. H. 2015. Anti-inflammatory effect of alginate oligosaccharides produced by an alginate-degrading enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 on LPS-induced RAW 264.7 cells. Korean J. Fish Aquat. Sci. 48, 888-897.

Kim, W. J., Choi, H. S. 1994. Development of combined methods for effective extraction of sea mustard. Korea J. Food Sci. Technol. 26, 44-50.

Kim, Y. Y., Cho, Y. J. 2000. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition. J. Korean Fish. Soc. 33, 325-330.

Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. American J. Soc. Hematol. 86, 1243-1254.

Lee, C. J., Song, E. J., Kim, K. B. W. R., Jung, J. Y., Kwak, J. H., Choi, M. K., Kim, M. J., Kim, D. H., Sunwoo, C., Park, J. G., Kim, J. H., Choi, J. I., Lee, J. W., Byun, M. W., Ahn, D. H. 2011. Effect of gamma irradiation on immune activity and physicochemical properties of *Myagropsis myagroides* water extract. Korean J. Fish Aquat. Sci. 44, 50-57.

Lee, D. W., Choi, W. S., Byun, M. W., Park, H. J., Yu, Y. M., Lee, G. M. 2003. Effect of  $\gamma$ -irradiation on degradation of alginate. J. Agric. Food Chem. 54, 4819-4823.

Lee, H. B., Choi, B. W., Chun, J. H., Yu, B. S. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. J. Korean Ind. Eng. Chem. 7, 1069-1077.

Lee, H. S., Jung, H. S., Kuen, H. S., 2000. Preparation of antibacterial agent from seaweed extract and its antibacterial effect. Korean J. Fish Soc. 33, 32-37.

Lee, M. K., Choi, S. H., Lim, H. S., Ahn, J. S. 2010. Quality

characteristics of *Jook* prepared with green laver powder. Korean J. Food Cookery Sci. 26, 552-558.

Lee, S. J., Song, E. J. Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Yoon, S. Y., Lee, C. J., Jung, J. Y., Park, N. B., Kwak, J. H., Park. J. G., Kim, J. H., Choi, J. I., Lee, J. W., Byun, M. W., Ahn, D. H. 2010. Effects of gamma irradiation on antioxidant, antimicrobial activities and physical characteristics of *Sargassum thunbergii* extract. Korean J. Food Sci. Technol. 42, 431-437.

Linker, A., Evans, L. R. 1984. Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 159, 958-964.

Liu, Y. N., Jeong, D. H., Jung, J. H., Kim, H. S. 2013. Quality characteristics and antioxidant activities of cookies added with purple sweet potato powder. Korean J. Food Cookery Sci. 29, 2287-1780.

Lotfy, S. 2009. Controlling degradation of low-molecular-weight natural polymer "dextrin" using gamma irradiation. Int. J. Biol. Macromol. 44, 57-63.

Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F., Kume, T. 2000. Radiationinduced degradation of sodium alginate. Polym. Degrad. Stab. 69, 279-285.

Nelson N. 1994. A photometric adaptation of the Somgyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.

Noh, M. j., Kwon, J. h., Byun, M. W. 2001. Water-soluble components of small red bean and mung bean exposed to gamma irradiation and methy bromide fumigation. Korean J. Food Sci. Technol. 33, 184-189.

Mizuno, H., Saito, T., Iso, N., Onda, N., Noda, K., Takada, K. 1983. Mannuronic to guluronic acid ratios of alginic acids prepared from various brown seaweeds. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49, 1591-1593.

Moncada, S., R. M. J. Palmer, E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43, 109-142.

Park, D. H., Jeong, G. T. 2013. Production of reducing sugar from macroalgae *Saccharina japonica* using ionic liquid catalyst. Korean Chem. Eng. Res. 51. 106-110.

Park, E. Y., Jeong, S. M., Kim, Y. J., Lee, D. H. 2012. Review on hydrolysis methods of the macroalgae for production of bioethanol. J Korea Soc. Waste Manage 29, 323-33.

Park, S. H. 2017. Characterization and functionality of enzymatic

extract of *Sargassum coreanum* using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. *Master Dissertation*. University of Pukyong, Busan, Korea.

Ren, L. N., Wang, X. F., Li, S., Li, J. L., Zhu, X. D., Zhang, L., Gao, F., Zhou, G. H. 2018. Effect of gamma irradiation on structure, physicochemical and immunomodulatory properties of *Astragalus* polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 641-649.

Rehm, B. H. A., Vall, S. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 48, 281-288.

Son, J. H., Jo, C., Kim, M. R., Kim, J. O., Byun, M. W. 2001. Effect of gamma irradiation on removal of undesirable color from green tea extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30, 1305-1308.

Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Park, J. G., Kim, J. H., Lee, J. W., Byun, M. W., Ahn, D. H., 2007. Effect of gamma irradiation on the physical properties of alginic acid and  $\lambda$ -carrageenan. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36, 902-907.

Song, E. U., Kim, A. J., Kim, M. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Park, J. U., Kim, J. H., Lee, J. W., Byun, M. Y., Ahn, D. H. 2008. Effect of gamma irradiation on degradation and antioxidation Activity of alginate and carrageenan. *Korean Society for Food Engineering.* 12,

58-64.

Stevens. R. A., Levin, R. E. 1977. Purification and characteristics of an alginase from *Alginovibrio aquatilis*. Appl. Environ. Microbiol. 3, 1156-1161.

Sunwoo, C., Kim, K. B. W. R., Kim, D. H., Jung, S. A., Kim, H. J., Jeong, D. H., Jung, H. Y., Kang, B. K., Bark, S. W., Lim, S. M., Hong, Y. K., Ahn, D. H. 2013. Optimization of conditions for the production and properties of alginate-degrading crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 41, 372-378.

Wasikiewicz, J. M., Yoshii, F., Nagaswa, N., Wach, R. A., Mitomo, H., 2005. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. Radiat. Phys. Chem. 73, 287-295.

Wong, T. Y., Preston, L. A. and Schiller, N. L. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and application. Annu. Rev. Microbiol. 54, 289-340.

Zainol, I., Akil, H. M., Mastor, A. 2009. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the physical and mechanical properties of chitosan powder. Mat. Sci.

Engin. 29, 292-297.

Zhu, B., Yin, H. 2015. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. Bioeng. 6, 125-131.



## 감사의 글

시간이 쏠살같이 지나갑니다. 한국에 온 지 2년 반이 됐는데 2년 동안의 석사과정을 마무리하며 지난 시간들을 돌이켜보니 많은 후회와 아쉬움이 남습니다. 한국에서의 유학생생활은 제 인생의 다른 시작이었습니다. 그 동안 한국말을 잘 못해서 힘들었지만 많은 분들의 격려와 도움으로 학업을 마쳤습니다. 이 기회를 통해 논문을 무사히 끝낼 수 있도록 아낌없는 관심과 도움을 주신 모든 분께 감사의 말씀을 전합니다.

먼저 이국에서 곤혹스러워하고 있던 저에게 기회를 주시고 부족함이 많은 저를 따뜻한 관심과 배려로 지도해주신 안동현 교수님께 진심으로 감사드립니다. 부모를 떠나 한국에 혼자 와서 가끔 외로웠는데 안동현 교수님께서 세심한 관심과 격려를 주셔서 저는 포기하지 않았습니다. 그리고 항상 인생의 도리를 가르쳐 주셨고 2년 동안 저는 얻는 것이 참으로 많았습니다. 정말 감사드립니다. 또한 저의 논문 심사를 맡아주신 전병수 교수님과 조승목 교수님께도 감사를 드리며 대학원과정동안 많은 학문적 지식을 습득하게 해주신 조양제 교수님, 김영목 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

처음 왔을 때 한국어 실력이 좋지 않았고 한국 대학원 생활이 익숙하지 않았지만 실험실 선배와 후배들 덕분에 한국어를 많이 배웠고 대학원 생활에 빠르게 적응하였습니다. 실험실에서 함께 실험하고 노력했던 시기를 평생 잊지 못할 것입니다. 졸업 끝까지 함께 하지 못해서 너무 아쉬웠습니다. 각자 하고자 하는 분야에서 최고가 되어 꼭 행복 하라는 말을 전하고 싶습니다. 또 마지막 학기에 관심과 도움을 많이 주신 정소미 박사님께도 감사드립니다.

항상 제가 하고자 하는 것들에 대해 저를 믿고 열심히 할 수 있도록 적

극적으로 지원해 주신 존경하는 아빠, 엄마, 언니에게 감사합니다. 저는 고등학교부터 기숙사 생활을 했고 부모님과 함께하는 시간이 거의 없었습니다. 중국에 돌아가면 부모께 효도해야 합니다. 우리가족은 앞으로 점점 더 좋아질 것입니다. 또한 항상 건강했으면 좋겠고 사랑합니다.

마지막으로 항상 응원해준 친구들에서도 감사한 마음을 전합니다. 멀리 있지만 제가 스트레스를 받을 때 항상 이야기로 스트레스를 풀어줘서 정말 감사합니다. 저 혼자만의 노력이 아닌 많은 분들의 격려와 가르침이 있었기에 무사히 논문을 완성할 수 있었습니다. 이 에 다시 한 번 도와 주신 모든 분들에게 감사를 드리며, 실망시키지 않고 후회 없는 삶을 살도록 하루하루 노력하는 사람이 되겠습니다.

