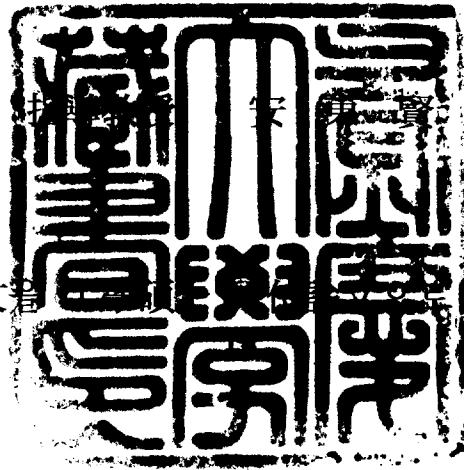


工學碩士 學位論文

비틀대 모자반 추출물의
항산화 효과



이 論文을 提出함

2006年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

趙 仙 熙

趙仙熙의 工學碩士 學位論文을 認准함.

2006년 2월

주 심 농학박사 김 선 봉



위 원 공학박사 전 병 수



위 원 농학박사 안 동 현



목 차

Abstract	1
서론	3
재료 및 방법	6
1. 실험 재료	6
1-1. 재료	6
1-2. 시약	6
2. 비틀대 모자반 용매별 추출물의 제조	6
3. Total phenolic compounds	7
4. 항산화 효과	9
4-1. TBARS(thiobarbituric acid-reactive substances) 측정	9
4-2. 전자 공여능	10
4-3. 금속 봉쇄력	10
4-4. 환원력	11
5. 항산화 물질 분리	12
5-1. Silica gel column chromatography에 의한 추출물의 분획	12
5-2. HPLC 측정	14
5-3. EI-Mass 측정	14

결과 및 고찰	16
1. 용매별 추출물의 수율	16
2. Total phenolic compounds	16
3. 항산화 효과	20
3-1. TBARS(thiobarbituric acid-reactive substances) 측정	20
3-2. 전자 공여능	21
3-3. 금속 봉쇄력	29
3-4. 환원력	30
4. 항산화 물질 분리	38
4-1. Silica gel column chromatography에 의한 분획물의 항산화 효과	38
4-2. HPLC 에 의해 분리된 획분의 항산화 효과	38
4-3. EI-Mass에 의한 물질의 동정	39
요 약	46
참 고 문 헌	49

Antioxidant Profiles of Extracts from *Sargassum sagamianum*

Sun-hee Cho

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

Abstract

In this study, the antioxidant activities of chloroform, ethanol, and water extracts from brown algae, *Sargassum sagamianum* were evaluated by various antioxidant assay, such as TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging, chelating effect, reducing power and total polyphenol compounds. Total phenolic compounds contained 33.2, 127.4 and 27.2 mg/g in chloroform, ethanol and water extracts, respectively. TBARS and DPPH radical scavenging of these extracts were compared to them of standard antioxidants such as tert-butylhydroxytoluene (BHT), α -tocopherol and ascorbic acid. Both of chloroform and ethanol extracts from *Sargassum sagamianum* have showed a strong antioxidant activities. Each 10 mg/mL of chloroform and ethanol

extracts were inhibited effectively 90.9% and 80.9% in TBARS assay system. The scavenging abilities in the chloroform, ethanol and water extracts of *Sargassum sagamianum* on DPPH radical were 96.8%, 95.6% and 100% at 5 mg/mL, respectively, which were greater than them of BHT, α -tocopherol and ascorbic acid at the same concentration. The chelating effect of chloroform extract from *Sargassum sagamianum* on ferrous ions was 74.2% at 10 mg/mL that was higher than them of other solvent extracts. Ethanol extract of *Sargassum sagamianum* at 10 mg/mL was shown a high reducing power which was much the same that of ascorbic acid. As a result of this experiment, it is indicated that *Sargassum sagamianum* is possible to use as a antioxidant material for functional foods. Ethanol extract of *Sargassum sagamianum* was purified by silica gel chromatography. Ethyl acetate-soluble acidic fraction was shown a strong antioxidant ability than them of others. Ethyl acetate-soluble acidic fraction was injected into reverse phase C₁₈ column using HPLC and obtained three main peaks. When compared antioxidant ability of three fractions, fraction 2 was shown the highest ability than that of others. Fraction 2 was analyzed by GC-Mass spectrum. The result was shown that fraction was contained one compound but not identified.

서론

식품의 가공 및 저장 중에 일어나는 지질의 산화는 식품에 있어서 이취의 발생, 변색 및 영양가의 저하 등으로 인하여 식품의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 산화에 의해 생성되는 각종 산화 생성물은 독성을 가지고 있어 암이나 동맥경화 및 노화를 일으킨다(Yagi, 1987). 특히 Free radical은 생체 물질인 DNA, RNA, 단백질, 지질 등과 반응하여 세포나 조직에 손상을 유발하며 생체의 방어 능력을 감소시켜 발암 및 돌연변이 등의 세포기능 장애를 유발하는 등 인체에 악영향을 끼친다(Bomzon et. al., 2001). 이를 억제하기 위해 항산화제에 관한 연구가 오래 전부터 진행되어 왔다(Vinson and Hontz, 1984). 항산화제는 각종 free radical 또는 유지의 peroxy radical에 수소나 전자의 공여체로 작용하여 비라디칼 화합물로 상쇄시킴으로써 산패를 억제하는 라디칼 소거제가 대표적이며 그 외에 기능상 금속 제거제, 과산화물 분해제와 상승제 등으로 나눌 수 있다. 수많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나, 그 효과와 경제성 때문에 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제로서 tert-butylhydroxytoluene(BHT), tert-butylhydroxyanisole(BHA), tert-butylhydroquinone(TBHQ)등이 있다. 그러나 합성 항산화제는 그 효과는 뛰어나지만 체내 흡수 물질의 일부가 독성물 혹은 기형발생인자 및 발암 물질화 되고(Ito, et. al., 1983) 간 비대증, 간장 중 microsomal enzyme activity가 증가하고, 폐, 신장 및 장기 조직의 병리적인 해를 유발시키는(Branen, 1975) 등의 안전성 문제가 제기되면서 천연항산화제에 대한 관심이 새롭게 대두되고 있다. 현재 사용되는 천연 항산화제로는 tocopherol, flavone 유도체, sesamol,

gossypol, 단백질의 가수 분해물 및 일부 향신료 등이 보고되어 있지만 단독으로는 산화반응 저지 능력이 낮으며(Halliwel, et. al., 1988) 실제 사용되고 있는 것은 tocopherol 정도이지만 tocopherol도 동물성 유지에만 효력이 있으며(Corl, 1974) 가격이 비싸다. 이에 항산화 효과가 높으면서 안전하고 경제적인 식물기원의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 많은 연구가 수행되어지고 있다.

해조류는 세계적으로 약 8,000종이 알려져 있는데, 우리나라의 근해에서도 약 600여 종이 알려져 있으며(Lee and Kang, 1986) 그 중 60~70여 종을 식용을 이용하고 있다(해조자원양식학, 1987). 해조류는 일반적으로 단백질과 지방의 함량이 낮고 탄수화물의 함량이 높으며 칼륨, 요오드, 칼슘 등 각종 무기염류와 비타민 A, C 등의 함량이 높다. 특히 갈조류가 함유하는 다당류는 대부분이 알긴산과 laminaran 및 fucoidan 등으로 구성되어 있다(수산 가공 이용학, 1994). 최근 해조류의 다당류들이 가지는 콜레스테롤 저하효과, 고지혈증 예방, 동맥경화 예방 등의 생리 활성이 있다는 연구들이 발표되었으나, 또한 해조로부터 항산화성 물질을 추출하고자 하는 노력은 1990년대 초반부터 이루어져(Park et al., 1991) 용매와 추출방법을 달리하여 측정하였고(Lee et al., 1996), 최근 감태, 톳, 잔가시 모자반, 곰피, 지누아리, 진두발, 갈래곰보 등의 항산화 효과를 측정한 연구(Lee et al., 1996; Kim et al., 2004; Ahn et al., 2004)가 보고되고 있지만 미비한 실정이다.

비틀대 모자반은 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류로 일본에 분포되고, 우리나라에서는 삼척, 영해, 울릉도, 주문진, 부산, 제주도 등 우리나라 전역에 폭 넓게 자생하고 있는 해조류로 학명은 *Sargassum sagamianum*이다. 형태상의 특징을 살펴보면, 중심가

지는 가늘고 나선상으로 비틀어져 있으며 수 개체의 짧은 가지들이 존재한다. 높이는 대략 30 cm 정도이고, 하부의 잎이 길이 10~15 mm, 폭 3~7 mm인데 반해 중상부의 잎은 길이 2~3 cm, 폭 3 mm 정도로 더 길다. 잎 가장자리는 전연이거나 더러는 조금의 톱니가 있고, 잎자루는 매우 짧으며 잎은 더러 가지의 한쪽에 편재한다. 기포는 타원형이고 끝이 뾰족하거나 또는 망을 가지며 납작한 짧은 자루가 있고 길이 5~7 mm, 폭 3~4 mm 정도로 가지 또는 작은 가지의 기부 부근에 단독으로 있거나 또는 없는 수도 있다. 저조선 부근의 파도가 센 곳의 암초 상에 생육한다.

현재까지 흔하게 볼 수 있는 자원임에도 비틀대 모자반에 관한 천연물화적이고 생물학적인 보고에 대한 자료는 그다지 많지 않다. 비틀대 모자반을 이용하여 독성 중금속 이온인 Pb 및 Cr의 생체 흡착 효과(Suh et al., 1999)를 알아본 연구 이외에 국내외에 이들을 이용한 다른 연구가 없다.

본 연구에서는 우리나라에 서식하고 있는 비틀대 모자반을 용매별로 추출하여 그것들의 지질 과산화 억제능, 전자공여능, 금속 붕쇄력, 환원력을 측정하고 페놀 화합물 함량을 분석하여 항산화 효과를 검토하고 활성 주성분을 규명함으로써 비틀대 모자반의 천연 항산화제로서 효능과 이용 가능성에 대하여 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 재료

본 실험에 사용한 비틀대 모자반은 송정과 기장 등 부산 연안에서 채취하여 담수로 깨끗이 씻은 다음 실온에서 완전히 건조하여 잘게 분쇄 시킨 후 -70°C 동결 저장하면서 사용하였다.

1-2. 시약

본 실험에 사용된 folin-ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2-thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid(TCA), dibutyl hydroxy toluene(BHT), potassium ferricyanide, tween-20, iron(II) chloride, iron(III) chloride, 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4', 4"-disulfonic acid sodium salt(ferrozine), Trifluoroacetic acid(TFA), $(\pm)$ - α -tocopherol, 등은 Sigma사(USA)의 특급시약을 사용하였으며 이동상으로서 HPLC급 methanol과 n-hexane은 TEDIA사 특급시약을 사용하였고 chloroform, ethyl acetate, ethylenediamine tetra-acetic acid(EDTA), L(+)-ascorbic acid는 일제 특급시약을 사용하였다.

2. 비틀대 모자반 용매별 추출물의 제조

분쇄한 일정량의 비틀대 모자반에 10배의 n-hexane, chloroform, ethanol, 증류수를 이용하여 추출하였다. 먼저 ethanol을 가하여 실온에서 24 시간 교반하면서 추출하였다. 추출

후 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 3000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 상층액을 취하고 얻어지는 잔사에 다시 같은 추출용매를 가하여 같은 방법으로 2회 반복 추출하였다. 침전 획분은 37℃에서 건조시킨 다음 용매를 차례대로 바꿔 동일한 방법으로 추출하였다. 3번의 추출로 모은 상층액을 filter paper(Advantec 5A)로 여과한 후 rotary evaporator(RE200, Yamato Co., Japan)로 농축하여 37℃에서 완전 건조하였다. 건조한 시료는 -20℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

3. Total phenolic compounds

총 페놀 화합물 함량은 Folin-Denis(Swain and Hillis, 1959)법을 변형하여 측정하였다. 즉 시료 용액 0.5 mL를 증류수 6.5 mL에 희석하고, folin-ciocalteu's phenol reagent를 0.5 mL 첨가하여, 3분간 방치한 후 무수 탄산나트륨 포화용액 1 mL를 첨가하고 증류수로 전체를 10 mL로 정용하여 상온에서 1시간 방치시킨 후, UV/visible spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Rochester NY., USA)로 765nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총 페놀 화합물은 gallic acid를 이용하여 작성한 검량곡선과 비교하여 함량을 구하였다. Gallic acid를 이용한 표준곡선은 gallic acid의 농도 0~120 µg/mL로 하고 위와 같은 방법으로 표준물질을 이용하여 표준 곡선을 작성하여 총 페놀 화합물 함량을 환산하였다. 검량선 식은 $y = 0.0051x + 0.0137$ ($R^2 = 0.999$)였다.

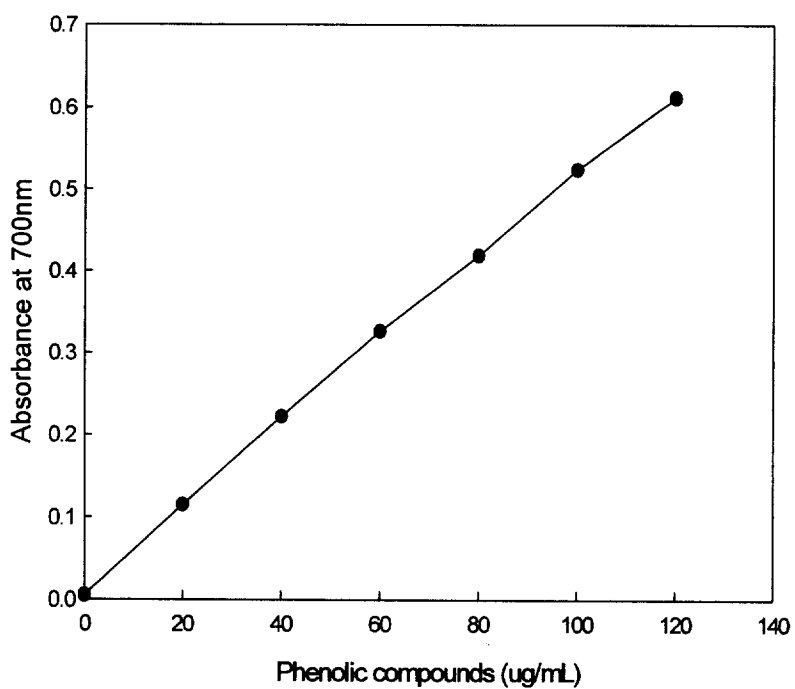


Fig. 1. Standard calibration curve of phenolic compounds by colorimetric method.

4. 항산화 효과

4-1. Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 측정은 Buege와 Aust(1978)의 방법에 따라 malonedialdehyde량을 측정하였다. Oil emulsion은 1 M의 potassium phosphate buffer(pH 6.5) 8 mL에 50 μ L의 tween-20을 넣고 교반한 후 0.25 mL의 참치 안구유를 넣고 10분 교반하였다. KOH를 3조각 넣어 교반하여 완전 용해시킨 후 1:1 HCl를 가하여 pH 6.5로 맞추어 증류수로 160 mL 정용하여 제조하였다. Oil emulsion은 사용직전에 만들어 사용하였다. Oil emulsion 0.5 mL에 시료(0.1 0.5 1.0 5.0 10.0 mg/mL) 0.1 mL와 0.05 M FeCl₂용액 0.1 mL을 넣고 D.W. 0.3 mL를 첨가하여 반응 혼합물 1 mL을 만들어 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응 혼합액에 7.2% dibutyl hydroxy toluene(BHT) 50 μ L를 첨가하여 반응 혼합물을 잘 섞어 반응을 정지시키고 TBA/TCA 용액 2 mL를 가하여 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 냉각 후 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)로 3000 rpm에서 10 분간 원심 분리시켰다. 상정액 1 mL를 취하여 UV/visible spectrophotometer(GENESYS 10 UV, Rochester NY., USA)로 531 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조구는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 또한 비틀대 모자반이 색소 성분을 가지고 있어 색소에 의한 흡광을 보정 해주기 위하여 공시험은 oil emulsion을 넣지 않고 같은 방법으로 측정하였다.

항산화능(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도} - \text{공시험의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

4-2. 전자 공여능

DPPH radical 소거효과는 Blois(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료(0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/mL) 1 mL에 0.2 mM DPPH 용액 1 mL를 넣고 vortex한 후 실온에서 30분간 방치한 다음 1 mL를 취하여 UV/visible spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Rochester NY., USA)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조구는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 또한 비틀대 모자반이 색소 성분을 가지고 있어 색소에 의한 흡광을 보정 해주기 위하여 공시험은 0.2 mM DPPH 용액 대신 methanol 1 mL를 넣어 흡광도를 측정하였다.

전자 공여능(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도} - \text{공시험의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

4-3. 금속 봉쇄력

금속 봉쇄력은 Shimada(1992)의 방법을 따라 측정하였다.

Sample 1 mL에 증류수 0.3 mL를 첨가하고 2 mM의 iron(II) chloride 용액 0.1 mL와 5 mM의 ferrozine 용액 0.2 mL를 첨가한 다음 실온에서 20분 반응 시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였고 대조구는 시료 대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 또한 비틀대 모자반이 색소 성분을 가지고 있어 색소에 의한 흡광을 보정 해주기 위하여 공시험은 sample을 같은 농도로 희석하여 흡광도를 측정하였다.

금속 봉쇄력(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도} - \text{공시험의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

4-4. 환원력

환원력은 Oyaizu(1986)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 200 mM sodium phosphate buffer(pH6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가해 충분히 혼합한 다음 50℃ water bath에서 20분 반응시킨 다음 10% TCA 용액 2.5 mL를 첨가하고 3000 rpm의 속도로 10분간 원심 분리하고, 이 상층액 2 mL에 증류수 2 mL와 0.1% iron(III) chloride 용액 0.4 mL를 가해 혼합한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 나타내었다.

5. 항산화 물질 분리 및 정제

5-1. Silica gel adsorption column chromatography에 의한 추출물의 분획

비틀대 모자반 ethanol 추출물 성분 중의 항산화 물질을 확인하기 위하여 silica gel column chromatography를 이용하여 1차 정제하였다. 즉, 활성화 된 silica gel(230~400 mes, Merck Co., Germany)을 n-hexane으로 slurry를 만들어 glass column (50×65 mm, 120 mL)에 충전한 후 3배의 n-hexane으로 세척하고 비틀대 모자반 ethanol 추출물을 methanol로 농도가 100 mg/mL가 되도록 희석하여 3000 rpm으로 5분간 원심분리(Hanil Ind., Korea)한 후 상층액 3 mL를 loading하였다. n-hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol을 용매계로 용리액은 360 mL씩 가하여 극성을 높이면서 순차 분획하여 분리된 분획물은 감압 농축하여 37℃에서 완전 건조시킨 후 methanol에 희석하여 TBARS 생성 억제능으로 항산화 효과를 측정하였다.

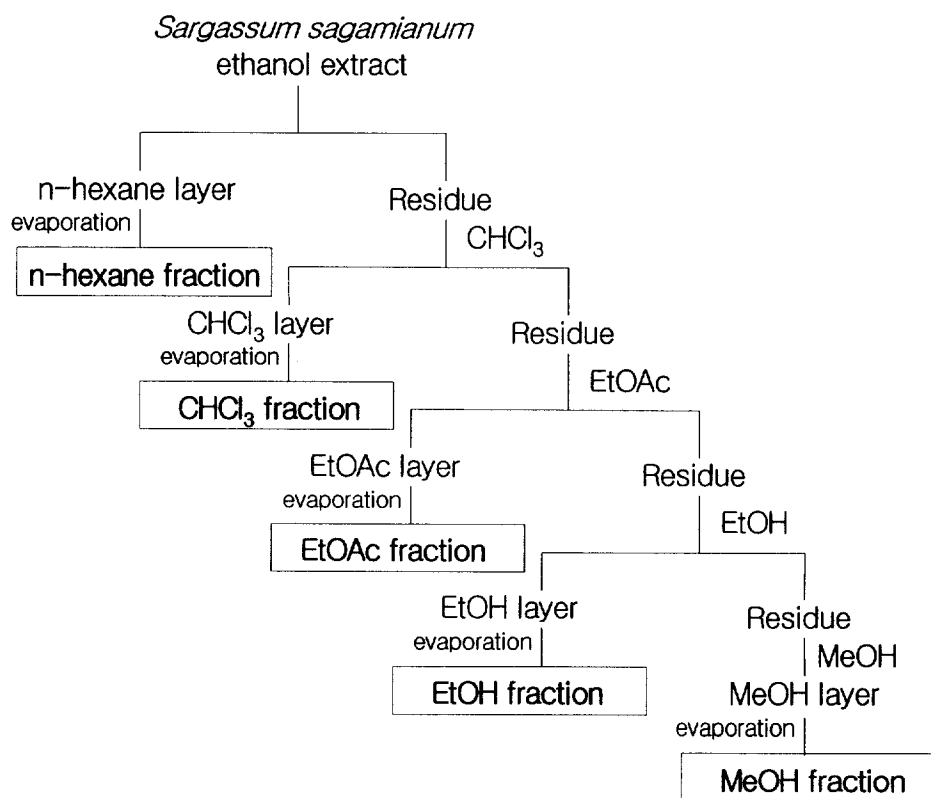


Fig. 2. Procedure for extracting *Sargassum sagamianum* and fractionating into different classes according to polarity.

5-2. HPLC 측정

비틀대 모자반의 ethanol 추출물 ethyl acetate 획분 분획은 waters system을 사용하였다. 시료는 비틀대 모자반 ethanol 추출물 ethyl acetate 획분을 건조하여 HPLC용 methanol로 3.125 mg/mL 농도가 되도록 희석하고 0.5 μ m membrane filter (Advantec MFS, Inc., Japan)로 여과하여 사용하였다. 분석조건은 column은 μ Bondapak C₁₈ 125Å10 μ m(Waters, Ireland)을 사용하였으며 이동상은 0.1% TFA가 함유된 100% HPLC용 methanol로 흐름 속도는 0.5 mL/min였다. 검출기는 Linear UVIS 204로 최고 흡수 파장인 248 nm에서 측정하였다. 이 때 injection volume은 20 μ L였다(Table 1). 각각의 fraction에서 용매를 건조시킨 후 TBARS 생성 억제능으로 항산화 효과를 비교하였다.

5-3. EI(Electrom Impact)-Mass 측정

HPLC로부터 분리된 fraction 2의 물질을 확인하기 위하여 얻어진 fraction을 완전 건조시킨 후 methanol을 이용하여 녹여 EI-Mass(JMS 700, JEOL Co., Japan)분석에 의해 동정하였다. DIP(direct inject prove)방법으로 high resolution과 low resolution을 측정하였다. 분석조건은 ion source 온도가 280°C, ionizing voltage가 70eV였다.

Table 1. Operate condition of HPLC

Requester		Condition
Instrument	pump	Waters model 600E
	detector	Linear UVIS 204
Column	μ Bondapak C ₁₈ 125 Å 10 μ m(Waters Ltd., Ireland)	
Guard column	3.9×300 mm	
Flow rate	0.5 mL/min	
Mobile phase	100% Methanol-0.1%TFA	

결과 및 고찰

1. 용매별 추출물의 수율

비틀대 모자반과 잔가시 모자반에 ethanol, 물, n-hexane, chloroform을 가하여 추출하였을 때 각각의 수율을 Table 1에 나타내었다. 비틀대 모자반의 n-hexane 추출물 0.21%, chloroform 추출물 5.79%, ethanol 추출물 5.51%, 물 추출물 22.22%였다. 용매 간의 수율은 물 추출물 > chloroform 추출물 > ethanol 추출물 > n-hexane 추출물 순으로 hexane과 같은 비극성 용매보다 극성이 강한 물에서 용출되는 성분이 많은 것을 알 수 있었다.

wax, 지질, terpenes 및 chlorophyll 등은 비극성 용매에 페놀 화합물, 방향족 아민, 단백질 및 탄수화물과 같은 수용성 물질은 acetone, ethanol, methanol 및 물 등의 극성 용매에 잘 추출된다.

따라서 물 추출물과 ethanol 추출물의 수율이 chloroform 추출물 n-hexane 추출물과 보다 수율이 높은 것은 비틀대 모자반에 존재하는 성분인 페놀 화합물과 다른 수용성 물질이 상당량 존재하기 때문이라 사료된다. 이러한 결과는 머루종자를 가지고 용매 별로 추출하여 비극성 용매계와 비교해 보았을 때 극성이 높은 유기용매 분획으로 갈수록 수율이 증가한다는 Kim(2005) 등의 보고와 일치함을 보였다.

2. Total phenolic compounds

페놀 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 일반적으로, 페놀 화합물은 한 개 또는 두 개 이상의 수산

기로 치환된 방향족 환을 가지고 있는 물질로, phenolic acid 및 coumarin류, flavonoid류 그리고 tannin류로 나누며 그 구조에 따라 이화학적 성질 및 생리적 기능(Pryce, 1972)이 달리 나타난다. 이들 페놀 화합물들은 식물체 및 인체의 항산화 효과(Laughton et al., 1981) 및 항균작용(Friend and Smith, 1977) 등의 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 또한 항혈전 작용, 고지혈증 억제 작용(Matsumoto et al., 1998) 및 지방간 억제작용 등 여러 작용이 알려져 있다. 페놀 화합물의 항산화성 정도는 식물의 종류 및 이들에 함유되어 있는 항산화 유효성분의 종류와 추출방법에 따라 현저한 차이가 난다고 한다. 따라서 항산화 활성과 페놀 화합물 함량과의 관련성을 검토하기 위하여 추출물 내의 총 페놀 화합물 함량을 측정하였다.

같은 조건하에서 추출된 각 추출물의 총 페놀화합물 함량은 Table 2에 나타내었다. 비틀대 모자반의 ethanol 추출물 127.4 mg/g of extract로 높은 페놀 화합물을 함유하였고 물 추출물과 chloroform 추출물은 각각 27.2 mg/g of extract, 33.2 mg/g of extract 함유하고 있어 ethanol 추출물이 다른 추출물에 비해 페놀 화합물이 많음을 보였다. Kim(2004) 등이 보고한 감태 물 추출물의 페놀 화합물 함량 26.5 mg/g of extract와 비슷한 함량을 보였으며 비틀대 모자반 ethanol 추출물의 경우 양파(shon et al., 2004)나 토마토, 다른 야채들(Wieland et al., 2005)보다도 많은 페놀 화합물을 함유하고 있었다. 이런 결과로 보아 추출 용매에 따라 페놀 화합물 함량에 차이가 있는 것으로 생각되어진다.

Table 2. Yield of each solvent extracts from
Sargassum sagamianum

Extract solvent	Yield (%)
n-hexane	0.21
chloroform	5.79
ethanol	5.51
water	22.22

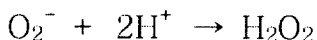
Table 3. Contents of total phenolic compounds in each solvent extracts of *Sargassum sagamianum* by Folin-Denis method

(mg/g of extract)	
Extract solvent	Total phenolics
chloroform	33.21
ethanol	127 .37
water	27.15

3. 항산화 효과

3-1. TBARS(thiobarbituric acid-reactive substances) 측정

Hydroxyl radical은 생체 고분자의 산화에 중요한 역할을 담당하는 radical로 세포 독성이 강하며, 생체 내 산화적 손상의 주역으로 보고되어 있다. Hydroxyl radical은 fenton반응에 의해서 만들어지고 생성된 OH•이 지방 산화를 촉진 시킨다.



그러므로 hydroxyl radical 소거 활성은 항산화 활성을 지표로 한 건강 기능성 탐색의 기준으로서 중요하다고 생각된다.

Oil emulsion의 산화로 생성된 malonedialdehyde는 TBA와 결합하여 발색하는 것을 이용하여 시료를 첨가하지 않고 TBA로 발색시킨 것에 대한 용매와 농도에 따른 소거 효과를 합성 항산화제 BHT, 지용성 항산화제 tocopherol 그리고 수용성 항산화제 ascorbic acid와 비교하여 나타내었다. 용매에 따른 TBARS 생성 억제 효과를 비교하면 chloroform 추출물이 그 효과가 가장 좋았으며 ethanol 추출물, 물 추출물 순으로 억제 효과를 나타내었다. 특히 비틀대 모자반의 chloroform 추출물은 5 mg/mL 이상의 농도에서 90% 정도의 효과를 나타내 항산화 효과가 뛰어난 합성 항산화제인 BHT와 비교해도 그 활성이 크게 차이나지 않았다. 비틀대 모자반 ethanol 추출물은 0.5 mg/mL의 낮은 농도에서부터 81.0%로 79.1%의 억제 효과를 나타낸 천연 항산화제인 tocopherol보다도 높은 항산화 효과를 나타내었다. 물 추출물의

경우 낮은 효과를 나타내어 BHT > tocopherol > ascorbic acid > 비틀대 모자반 순의 억제 효과를 보였다.

항산화 성분 함량과의 관계를 살펴보면 다량의 페놀 화합물을 함유하고 있는 비틀대 모자반 ethanol 추출물의 TBARS 억제 효과가 매우 높았으며 비틀대 모자반의 chloroform 추출물은 페놀 화합물이 ethanol 추출물에 비해 1/4정도의 낮은 함유량임에도 불구하고 높은 TBARS 억제 효과를 나타내었는데 강한 항산화 효과를 나타내는 성분이 함유되어 있기 때문이라고 사료된다. 또, 30 mg/g 를 기준으로 그 이상인 시료에 비해 그 이하의 함량을 보인 다른 시험구는 억제 효과가 30% 내외로 급격히 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이 결과로 페놀 화합물의 함유량 뿐만 아니라 성분의 종류에 따라 항산화 효과의 현저한 차이가 남을 알 수 있었다.

3-2. 전자 공여능

생체막 구성성분을 파괴하며 각종 산화 작용을 나타내는 활성 산소를 소거하여 줄 수 있는 활성을 알아보기 위하여 비틀대 모자반 추출물의 전자 공여능을 항산화제 BHT, 지용성 항산화제 tocopherol 그리고 수용성 항산화제 ascorbic acid와 비교하여 살펴보았다. 전자 공여능 측정에 사용되는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 비교적 안정한 radical을 갖는 물질로 다른 free radical들과 결합하여 안정한 복합체를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 radical이 소거되면서 고유의 청남색이 옅어지는 특성이 있으므로 이러한 색차를 비색 정량하여 전자 공여능력을 측정할 수 있다. 비록 화학적으로 유도되는 radical이지만 lipxygenase로 촉매 되는 지질 산화 반응계에서 측정된 항

산화 활성과도 잘 부합되므로 간편하고 신뢰성이 높은 항산화 활성 측정 방법으로 널리 이용되고 있다.

비틀대 모자반은 모든 추출물에서 시료의 농도가 높아질수록 DPPH에 대한 전자 공여능도 증가하는 경향을 나타내었으며 용매 별로는 chloroform 추출물 > ethanol 추출물 > 물 추출물 순으로 높은 소거 효과를 보였다. 특히 chloroform 추출물은 5 mg/mL 이상의 농도에서 100% free radical을 소거함을 나타내었다. Ethanol 추출물에서 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 95% 이상의 소거 효과를 보여 합성 항산화제 BHT와 천연 항산화제 tocopherol과 유사한 소거 효과를 나타내었으며, 물 추출물도 1 mg/mL이상의 농도에서 90% 정도의 높은 소거 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 TBARS 생성 억제 효과와 유사한 결과로 가장 높은 TBARS 생성 억제 효과를 나타내었던 chloroform 추출물이 free radical 소거 효과가 가장 높았으며 그 다음으로 ethanol 추출물이 그 뒤를 이어 높은 소거 효과를 나타내어 radical을 소거함으로써 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

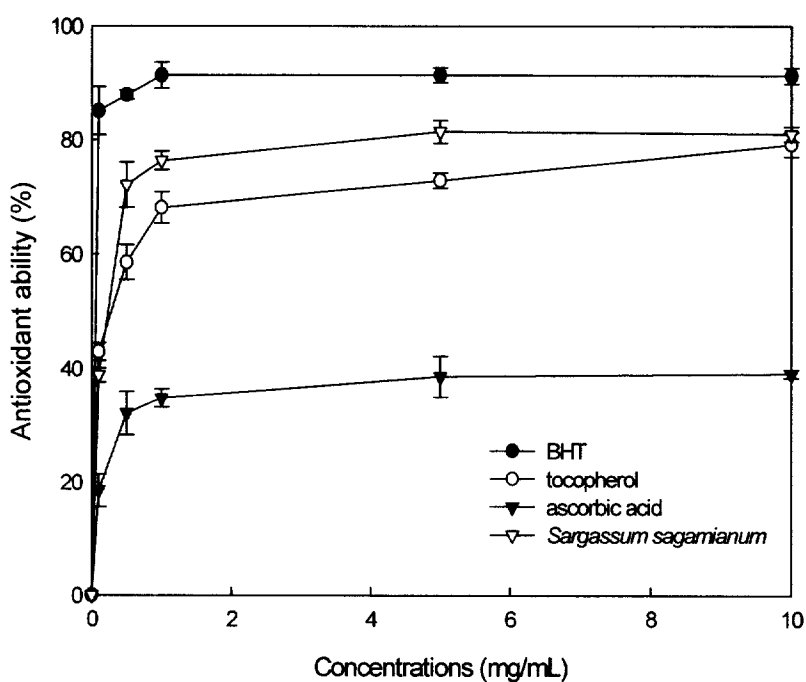


Fig. 2. Comparison of antioxidant ability with ethanol extract of *Sargassum sagamianum* and natural antioxidant materials.

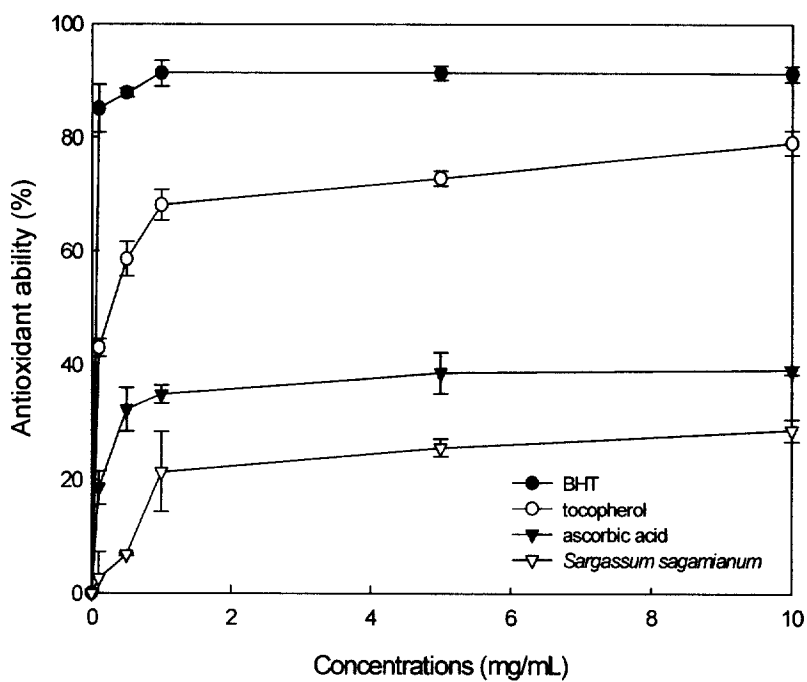


Fig. 3. Comparison of antioxidant ability with water extract of *Sargassum sagamianum* and natural antioxidant materials.

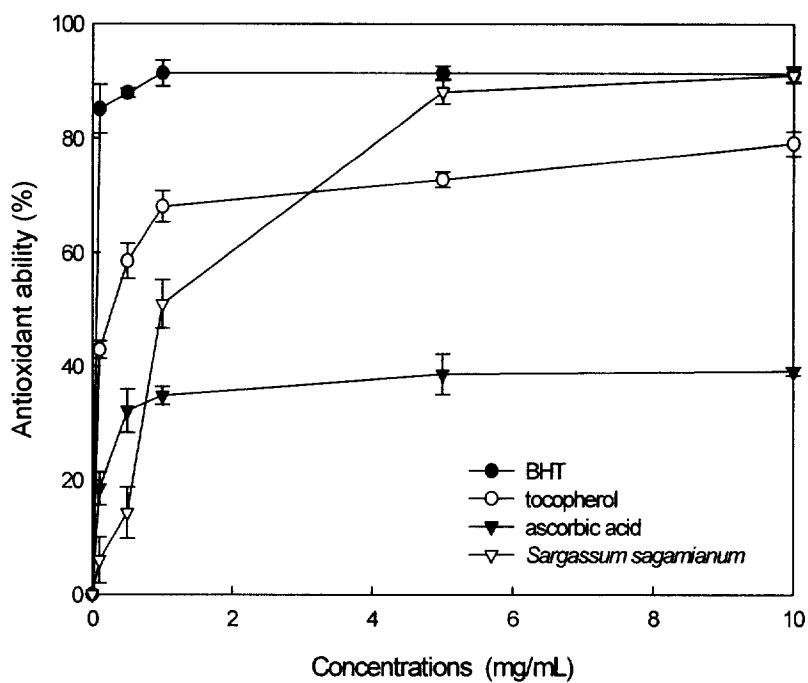


Fig. 4. Comparison of antioxidant ability with chloroform extract of *Sargassum sagamianum* and natural antioxidant materials.

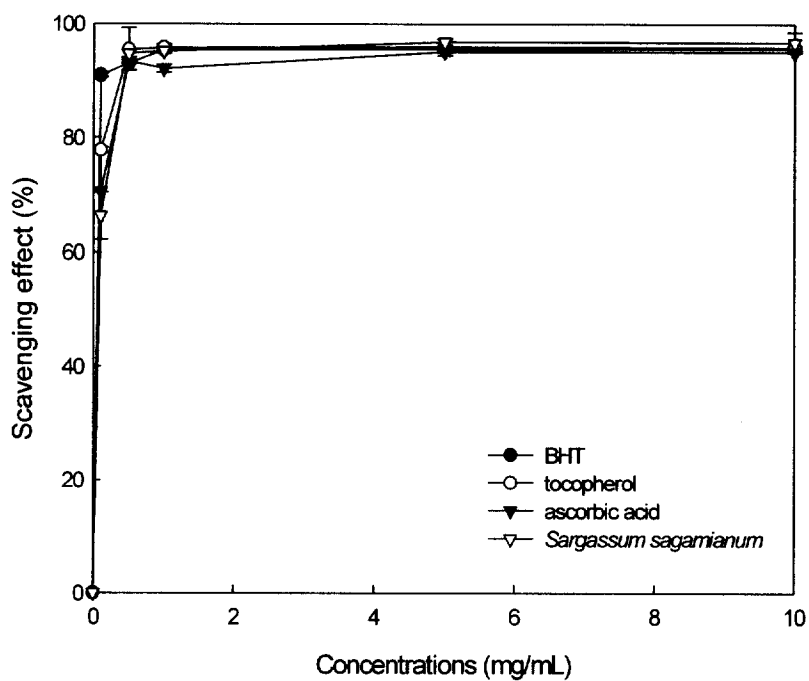


Fig. 5. Effect of DPPH radical scavenging in ethanol extract of *Sargassum sagamianum*.

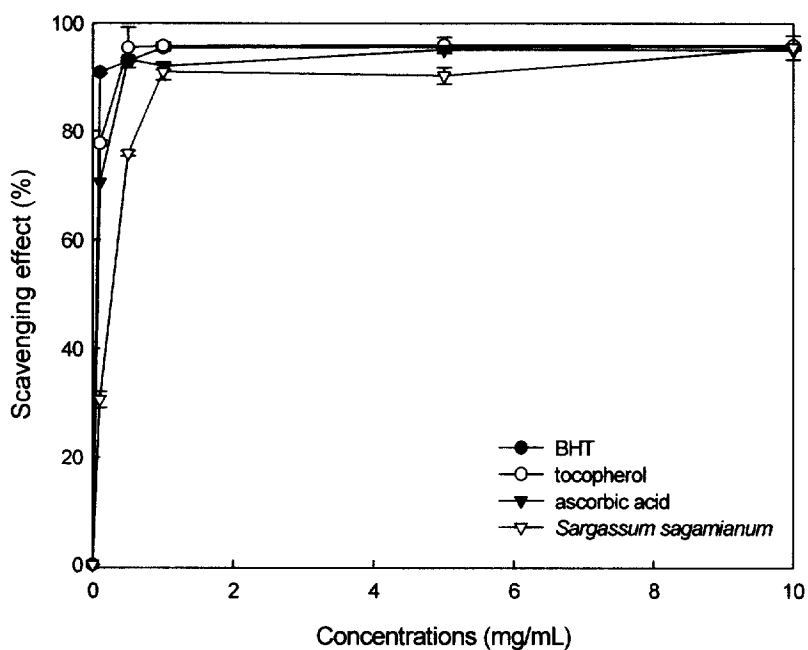


Fig. 6. Effect of DPPH radical scavenging in water extract of *Sargassum sagamianum*.

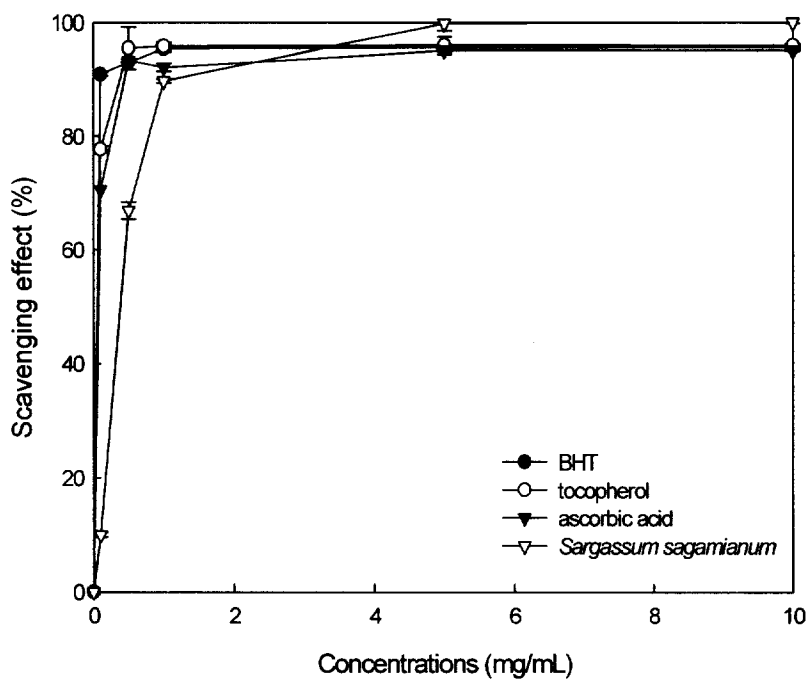


Fig. 7. Effect of DPPH radical scavenging in chloroform extract of *Sargassum sagamianum*.

3-3. 금속 봉쇄력

지질의 산화는 금속 이온에 의하여 크게 촉진을 받으므로 금속 봉쇄력은 미량 금속을 붙들어 두어 금속 촉매제로 인한 free radical의 생성을 막아 산화의 촉매 작용을 방지할 수 있는 능력 여부를 판단할 수 있는 지표가 된다. 앞선 TBARS 생성 억제 효과에서 hydroxyl radical은 fenton 반응에 의하여 생성된 것이므로 측정된 TBARS 생성 억제 효과가 직접적으로 hydroxyl radical을 소거한 것인지 또는 반응계 내 금속을 봉쇄한 것인지 구별할 필요가 있다. Fe^{2+} 는 ferrozine과 결합물을 형성하여 발색하게 되는데 반응계 내의 Fe^{2+} 를 봉쇄하여 ferrozine과의 결합물 형성을 억제하는 정도를 EDTA와 비교하여 백분율로 나타내었다.

EDTA는 대부분의 금속과 결합하여 킬레이트 화합물을 형성하는 대표적 킬레이트제로 0.1 mg/mL의 농도에서도 98%로 높은 금속 봉쇄 효과를 나타내었다. 그러나 비틀대 모자반의 ethanol 추출물은 5 mg/mL의 농도에서 10.6%를 나타내었으나 10 mg/mL의 농도에서 오히려 더 낮아져 0.5%로 철 이온과 결합하여 킬레이트 화합물을 형성하지 못하였다. 물 추출물에서도 28.3%의 낮은 효과를 나타내었다. 그러나 chloroform 추출물은 ethanol 추출물과 물 추출물에 비하여 높은 효과를 나타내어 10 mg/mL의 농도에서 69.6%의 비교적 높은 금속 봉쇄 효과를 나타내었다. 비틀대 모자반의 ethanol 추출물의 성분은 전자나 수소를 내어주어 radical 소거하는 효과가 뛰어난 반면 금속과 결합하여 킬레이트 화합물을 형성하는 능력은 낮으므로 생성된 radical을 소거함으로써 지질의 산화를 억제하지만 비틀대 모자반의 chloroform 추출물은 금속을 봉쇄하여 radical 형성 자체를 억제함과 동시에 생성

된 radical을 소거함으로서 TBARS 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

3-4. 환원력

환원력은 항산화력과 밀접한 관계가 있으며, 일반적으로 reductones의 존재와 연관이 있다. Gordon(1990)에 따르면, 항산화 반응은 reductones이 제공하는 수소원자가 free radical 사슬을 분해함으로써 시작되며, reducing power는 첨가되는 시료의 농도 변화에 따라 큰 변화를 나타내었다고 보고하였다.

각각의 추출물을 0.1 mg/mL에서 10 mg/mL까지 농도별로 첨가하였을 때 측정된 환원력을 대조구로 ascorbic acid와 비교하여 Fig.로 나타내었다. ascorbic acid는 천연 항산화제로 알려져 있는데 단독으로 사용했을 시 항산화 효과가 미약하지만 다른 항산화 효과를 가진 물질과 같이 사용하면 그 효과를 높여주는데 이는 금속을 봉쇄할 뿐 아니라 산화-환원 전위차를 환원영역으로 옮겨놓거나 수소를 내어주어 자신은 산화되면서 다른 물질을 환원시키는 성질을 가지고 있기 때문이다. 모든 실험구들은 농도가 증가함에 따라 그 효과도 증가하는 경향을 보였다. 용매별로 비교해보면 ethanol > chloroform > 물 추출물 순의 환원력을 나타내었으며 특히 비틀대 모자반의 ethanol 추출물은 10 mg/mL의 농도에서는 ascorbic acid만큼의 높은 환원력을 나타내어 수소나 전자를 쉽게 내어주어 radical을 non-radical로 전환 시키는 것으로 나타내었다. 비틀대 모자반 ethanol 추출물은 단독으로 뿐만 아니라 다른 항산화제와 같이 사용하였을 시 그 효과가 상당히 증가할 것으로 사료된다. 비틀대 모자반 chloroform 추출물은 ethanol 추출물보

다는 그 효과가 높지 않았지만 10 mg/mL의 농도에서 ascorbic acid의 2/3정도의 비교적 높은 효과를 나타내었으며 물 추출물은 낮은 효과를 나타내었다.

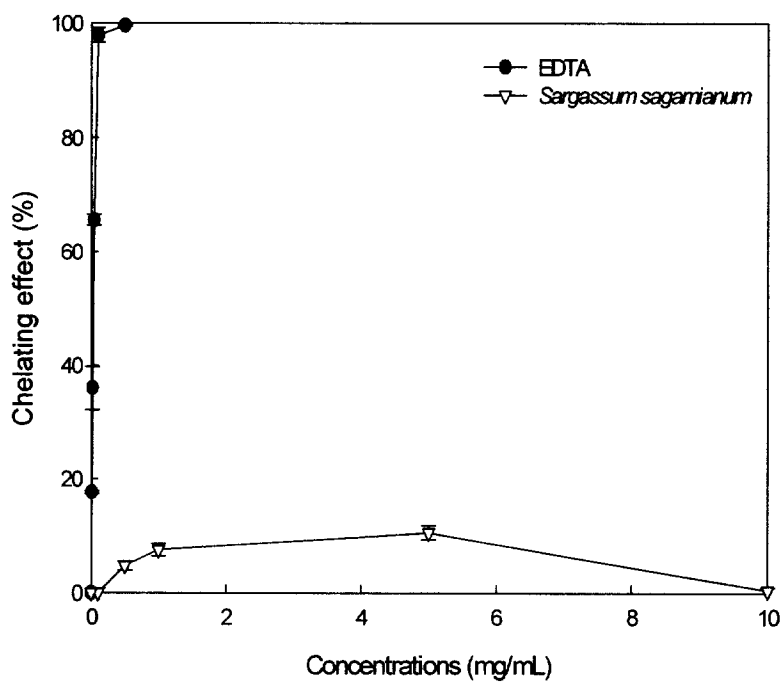


Fig. 8. Effect of metal ions chelating in ethanol extract of *Sargassum sagamianum*.

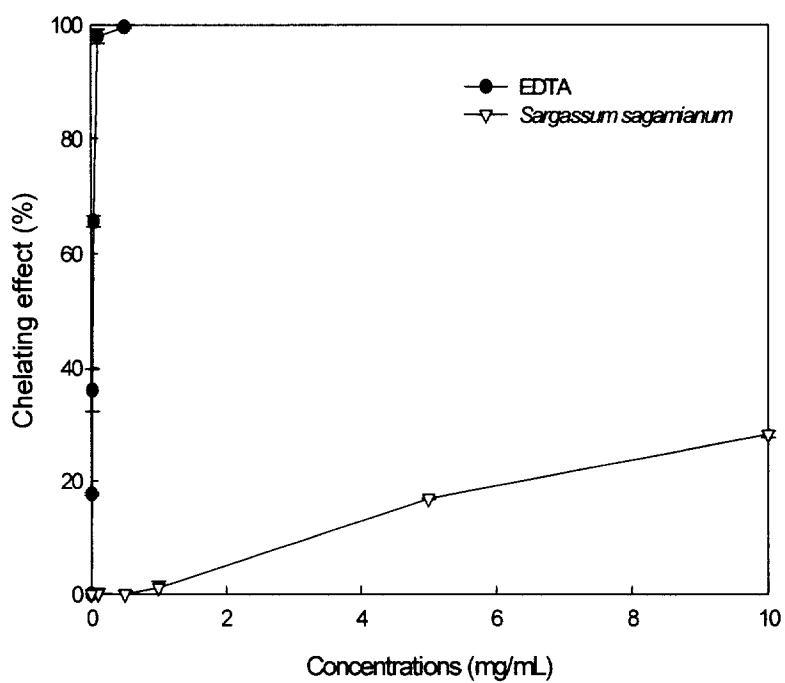


Fig. 9. Effect of metal ions chelating in water extract of *Sargassum sagamianum*.

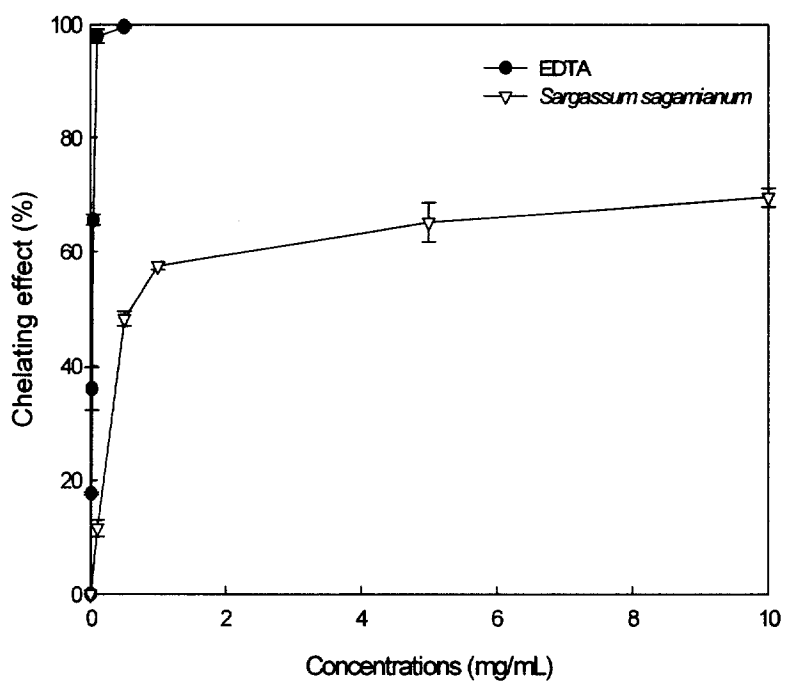


Fig. 10. Effect of metal ions chelating in chloroform extract of *Sargassum sagamianum*.

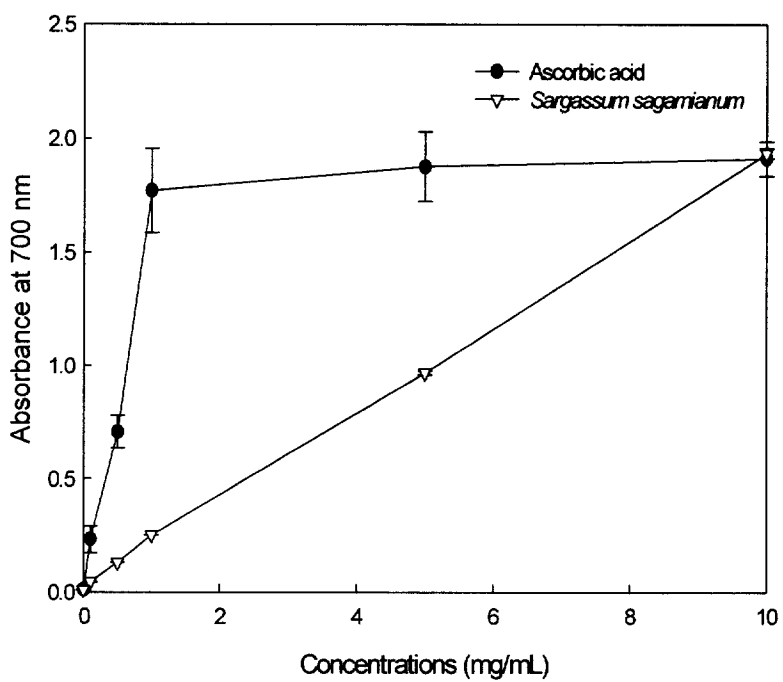


Fig. 11. Ferrous-reducing power in ethanol extract of *Sargassum sagamianum*.

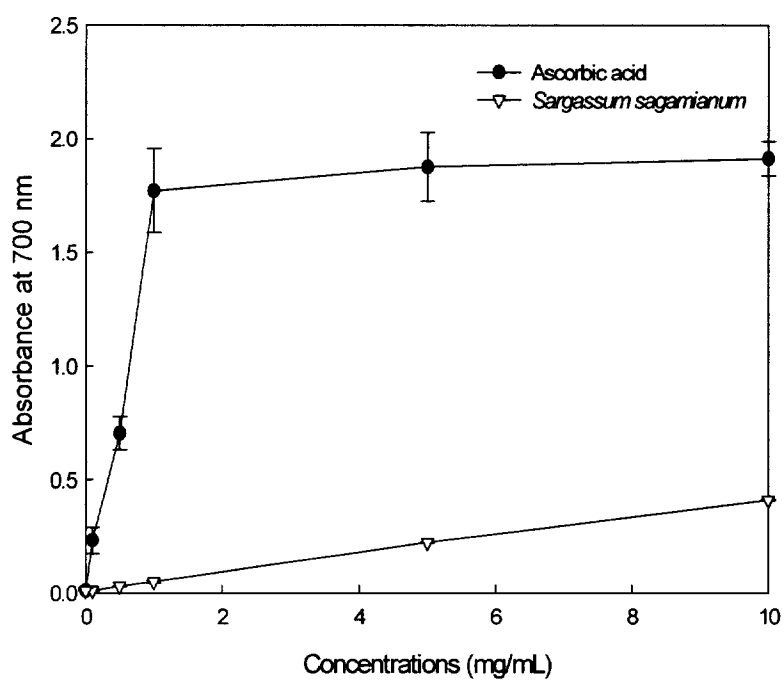


Fig. 12. Ferrous-reducing power in water extract of *Sargassum sagamianum*.

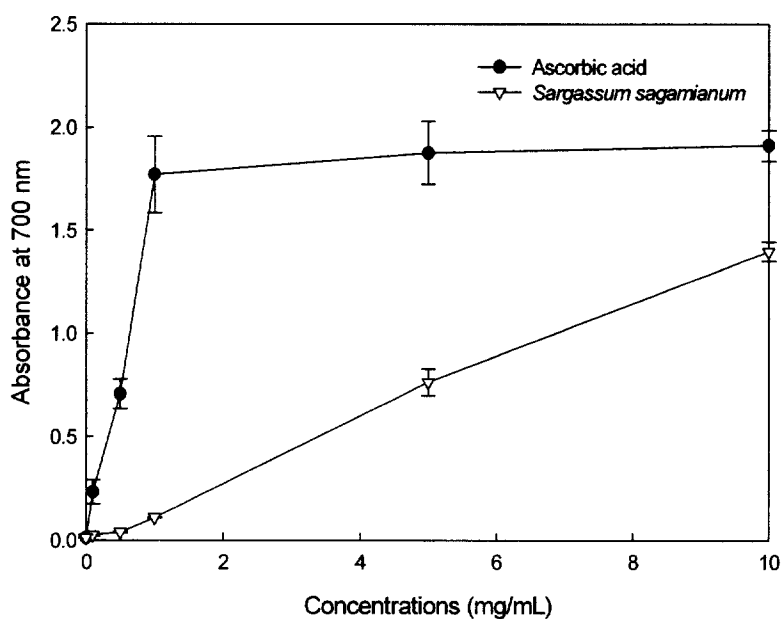


Fig. 13. Ferrous-reducing power in chloroform extract of *Sargassum sagamianum*.

4. 항산화 물질 분리

4-1. Silica gel column chromatography에 의해 분리된 분획물의 항산화 효과

항산화 효과의 결과를 바탕으로 비틀대 모자반 ethanol 추출물을 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. 용매는 hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol을 선택하여 분리 과정을 수행하였다. Hexane에 의해 분리된 획분은 없었으며 chloroform 획분이 37.8%로 가장 수율이 높았다(Table 4). 비틀대 모자반 ethanol 추출물의 성분들은 대부분 극성이 작은 용매에서 분리되어 극성이 작음을 알 수 있었다. 분리된 획분을 각각 농축 건조 시킨 후 5.0, 1.0, 0.5 mg/mL의 농도로 희석하여 TBARS 생성 억제 효과를 측정한 결과 ethyl acetate 획분이 0.5 mg/mL의 농도에서도 84.86%의 높은 효과를 보였다(Table 5).

4-2. HPLC에 의해 분리된 획분의 항산화 효과

Silica gel column chromatography를 행한 후 활성이 가장 좋은 ethyl acetate 획분을 HPLC 상에서 μ Bondapak C₁₈ reverse-phase column을 사용하여 분리하였다. 이동상으로 methanol-0.1% TFA(trifluoroacetic acid)를 이용하였으며 분리된 각각의 fraction은 건조하여 TBARS 생성 억제 효과로 항산화 효과를 측정하여 Table 6에 나타내었다. 각각의 획분에 대한 항산화 효과 실험 결과 3개의 fraction 모두 분획 전의 ethanol 추출물보다 높은 80% 이상의 높은 항산화 효과를 나타내었으며 특히

fraction 2는 0.5 mg/mL에서도 효과를 유지하여 비틀대 모자반 ethanol 추출물의 항산화 물질은 모든 fraction에 존재하지만 주요 항산화 물질은 fraction 2에 존재하는 것으로 사료된다.

Fraction 2의 항산화 기작과 그 성분을 알아내기 위해 일부는 GC-MS로 분석하고 일부는 0.5 mg/mL의 농도로 희석하여 DPPH radical 소거능, 금속 봉쇄력, 환원력을 측정하였다(Table 7). DPPH radical 소거능은 96.07%로 대조구로 이용한 BHT, α -tocopherol, ascorbic acid 보다는 높은 소거능을 나타내었다. 그러나 금속 봉쇄력은 1.12%로 극히 낮게 나타났으며 환원력은 ascorbic acid의 약 50% 정도로 높은 환원력을 나타내었다. Fraction 2는 free radical에 수소나 전자의 공여체로 작용하여 비라디칼 화합물로 상쇄시킴으로써 산패를 억제하는 라디칼 소거제로서 항산화 작용을 하는 것으로 사료된다.

4-3. EI-Mass(Electrom Impact)에 의한 물질의 동정

Fraction 2의 EI-Mass 분석 결과를 Fig. 15에 나타내었다. fraction 2는 단일 성분이고 low resolution과 high resolution을 측정하여 이 물질의 분자량이 424.263MW로 확인되었으나 library 검색에 의해 확인되지 않았다.

갈조류의 세포에는 갈조 tannin 이라고 총칭되는 phloroglucinol 및 그 유도체가 함유되어 있는데 이의 80여종 이상이 분리, 동정되어 있으며(Glombitza et al., 1973), 갈조류 및 홍조류에서 많은 terpenoid가 분리되어(Fenical et al., 1973) 항산화능(Mau et al., 2003)이 보고되어지고 있다.

Table 4. Yields of various solvent fraction from ethanol extract of *Sargassum sagamianum*

Solvent	Yields(%)
n-Hexane	0
Chloroform	37.8
Ethyl acetate	31.5
Ethanol	27.0
Methanol	4.3

Table 5. Comparison of antioxidant ability with various solvent fractions from *Sargassum sagamianum* ethanol extract

Solvent	Concentrations (mg/mL)		
	5	1	0.5
	(%)		
n-Hexane	0	0	0
Chloroform	88.34±1.1	81.85±2.5	71.07±3.5
Ethyl acetate	88.33±0.6	86.69±0.3	84.86±1.2
Ethanol	74.36±4.2	40.97±6.7	31.61±5.7
Methanol	42.51±5.6	6.86±1.0	1.94±4.9

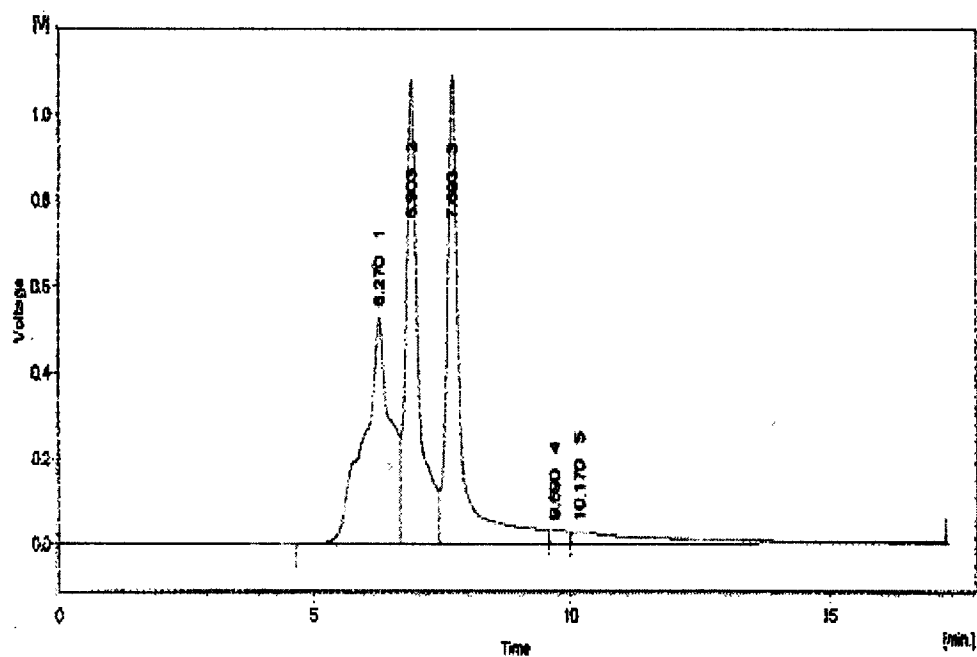


Fig. 14. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from ethanol extract of *Sargassum sagamianum*.

Table 6. Comparison of antioxidant ability with HPLC fraction of ethyl acetate depending concentration from *Sargassum sagamianum* ethanol extract

	(%)	
	Concentrations (mg/mL)	
	1	0.5
Fraction 1	83.47±2.0	72.96 ±3.5
Fraction 2	84.39 ±1.6	84.08 ±2.7
Fraction 3	81.72 ±0.9	65.60 ±2.7

Table 7. Comparison of antioxidant ability with fraction 2 of ethyl acetate depending concentration from *Sargassum sagamianum* ethanol extract

	TBARS (%)	DPPH radical scavenging effect(%)	Chelating effect (%)	Reducing power (absorbance at 700 nm)
BHT	87.90±0.8	93.02±0.1	—	—
α-Tocopherol	58.57±3.0	95.47±3.7	—	—
Ascorbic acid	32.18±3.9	14.50±0.6	—	0.678 ±0.0
EDTA	—	—	99.76±0.2	—
Fraction 2	84.08±2.7	96.07±0.1	1.21±0.9	0.346±0.0

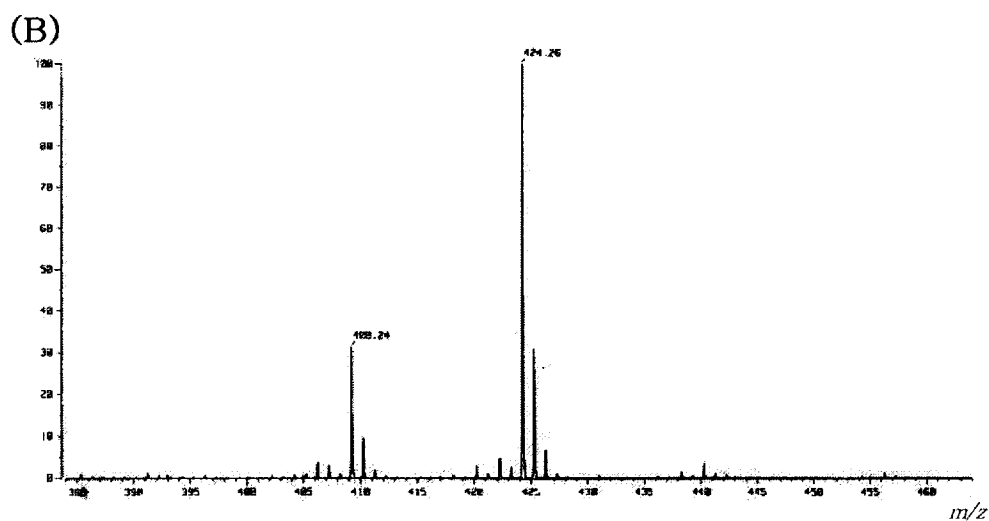
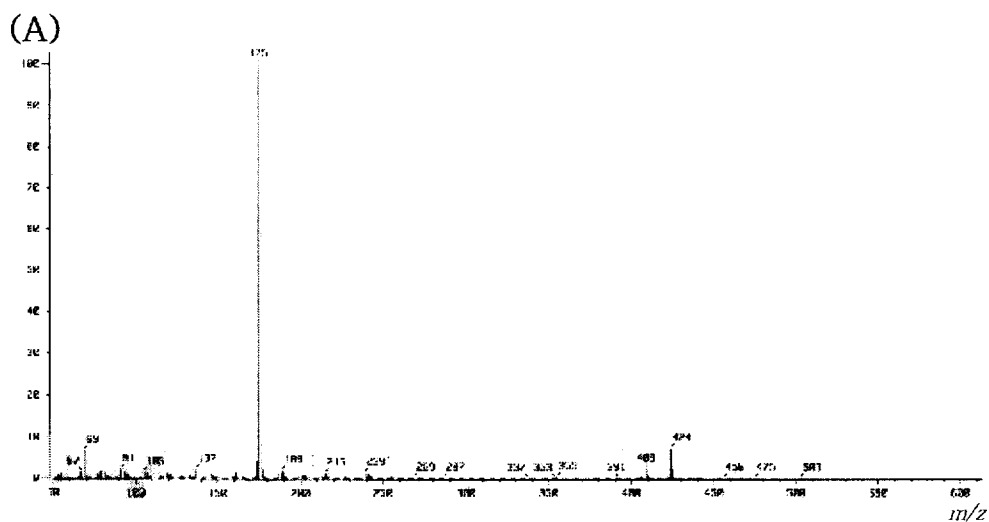


Fig. 15. Profile of EI-Mass spectrum from the fraction 2.

(A) Low resolution, (B) High resolution.

요 약

비틀대 모자반으로부터 chloroform, ethanol, 물을 이용하여 추출하고 이를 TBARS 생성 억제능, DPPH radical 소거능, 금속 봉쇄력, 환원력과 페놀 화합물의 함량을 측정함으로써 항산화 효과를 알아보았으며, 항산화 효과가 우수한 ethanol 추출물을 silica gel chromatography, HPLC, EI-Mass, FT-NMR로 활성 주성분을 알아보았다.

1. 비틀대 모자반의 용매별 수율은 n-hexane, chloroform, ethanol, 물이 각각 0.21, 5.79, 5.51, 22.22%로 n-hexane과 같은 비극성 용매보다 극성이 강한 물에서 용출되는 성분이 많은 것을 알 수 있었다.

2. 용매별 추출물의 페놀 화합물 함량을 측정한 결과 ethanol 추출물이 127.4 mg/g extract로 가장 많은 페놀 화합물을 함유하였고 물 추출물과 chloroform 추출물은 각각 27.2, 33.2 mg/g extract를 함유하였다.

3. 비틀대 모자반 추출물의 TBARS 생성 억제 효과는 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, chloroform 추출물 > ethanol 추출물 > 물 추출물 순으로 높은 효과를 보였다. 비틀대 모자반 chloroform 추출물은 5 mg/mL에서 88.12%로 91.34%를 나타낸 BHT와 유사하게 높은 효과를 나타내었다.

4. 비틀대 모자반 추출물에서 시료의 농도가 높아질수록 전자 공여능도 증가하여 1 mg/mL 이상의 농도에서 90% 이상 DPPH radical을 소거하였다. 특히 chloroform 추출물은 5 mg/mL 이상의 농도에서 100% DPPH radical을 소거하였으며 ethanol 추출물은 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 95% 이상의 소거 효과를 보여 BHT와 α -tocopherol보다 높은 소거 효과를 나타내었다.

5. 비틀대 모자반의 금속 봉쇄력은 용매 간에 큰 차이를 보여 10 mg/mL의 농도에서 ethanol 추출물 0.5%, 물 추출물 28.3%, chloroform 추출물은 69.6%의 효과를 나타내어 chloroform 추출물의 금속 봉쇄력이 가장 높았다.

6. 환원력을 용매별로 비교해 보면 ethanol 추출물 > chloroform 추출물 > 물 추출물 순의 효과를 나타내었으며 특히 비틀대 모자반의 ethanol 추출물은 10 mg/mL의 농도에서는 ascorbic acid만큼의 높은 환원력을 나타내었으나 물 추출물은 효과가 미비하였다.

7. 전반적으로 우수한 효과를 나타낸 비틀대 모자반 ethanol 추출물을 silica gel column chromatography를 이용하여 분리하였다. 분리된 획분의 TBARS 생성 억제 효과를 측정한 결과 ethyl acetate 획분이 0.5 mg/mL의 농도에서도 84.86%의 높은 효과를 보였다.

8. 높은 효과를 보인 ethyl acetate 획분을 HPCL 상에서 μ

Bondapak C₁₈ reverse-phase column을 사용하여 3개의 peak를 분리하였다. 분리 된 3개의 fraction은 TBARS 생성 억제 효과를 측정한 결과 fraction 2가 가장 높았다. Fraction 2를 0.5 mg/mL의 농도로 희석하여 DPPH radical 소거능, 금속 봉쇄력, 환원력을 측정한 결과 DPPH radical 소거능은 96.07%, 금속 봉쇄력은 1.12%, 환원력은 ascorbic acid의 약 50%의 효과를 보여 수소나 전자의 공여체로서 효과가 매우 높았다.

9. Fraction 2의 EI-Mass 분석 결과 fraction 2는 단일 성분으로 분자량은 424MW로 확인되었으나 library 검색에 의해 확인되지 않았다.

참 고 문 헌

- Ahn, C. B., Jeon, Y. J., Kang, D. S., Shin, T. S. and Jung, B. M. 2004. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweeds *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. *Food Research International*, 37, 253~258.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1990~2100.
- Bomzon, A. and Ljubuncic, P. 2001. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacology & therapeutics*, 89(3), 295~308.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy toluene and butylated hydroxy anisole. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59~63.
- Buege, J. A. and Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302~310.
- Corl, M. M. 1974. Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and their mode of action. *JAOCs*, 51, 321.

- Fenical, W. Sims, J. J. and Radlick, P. 1973. Chondriol, a halogenated acetylene from the marine alga chondria oppositoclada. *Tetrahedron letters: The international organ for the rapid publication of preliminary communications in organic chemistry*, 14(4), 313~316.
- Friend, W. G. and Smith, J. J. B. 1977. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Annual review of entomology*, 22, 309~331.
- Glombitza, K. W. Hauperich, S. and Keusgen, M. 1997. Phlorotannins from the brown algae *Cystophora torulosa* and *Sargassum spinuligerum*. *Natural toxins*, 5(2), 58~63.
- Gordon, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In food antioxidants. Hudson B.J.F., ed. Elsevier Applied Science, London/New York. pp. 1~18.
- Halliwell, B., Hoult, R. J. and Blake, D. R. 1988. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J.*, 2, 2867~2870.
- Hiroiyuki, H., Harumi, I., Yolanda, S., Tetsuya, O., Yumi, K. and Isao K. 1997. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,

5(5), 865~871.

Ito, N., Fukushima, S. and Hasebawa, A. 1983. Carcinogenicity of BHA in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 343.

Kim, J. A. and Jong, M. L. 2004. The change of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Hizikia fusiformis* with drying methods. *Korean J. Food culture*, 19(2), 200~208.

Kim, N. Y., Kim, Y. K., Bae, K. J., Choi, J. H., Moon, J. H., Park, G. H. and Oh D. H. 2005. Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts and fractions of wild grape seed(*Vitis coignetiea*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34(6), 755~758.

Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. S. and Halliwell, B. 1981. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion reducing ability. *Biochem. Pharm.*, 42, 1673~1681.

Lee, B. H., Choi, B. W., Chun, J. H. and Yu, B. S. 1996.

Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds.
Journal of Korean Ind. & Eng. Chemistry, 7(6),
1069~1077.

Lee, I. K. and Kang, J. W. 1986. A check list of marine
algae in korea. *The Korean Journal of Phycology*, 1(1),
311~325.

Matsumoto, N., Okushio, K. and Hara, Y. 1998. Effect of
black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed
rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*,
44(2), 337~342.

Mau, J. L., Eric, Y. C., Lai, N. P., Wang, C. C., Chen, C. H.,
and Chyau, C. C. 2003. Composition and antioxidant
activity of the essential oil from *Curcuma zedoaria*. *Food
Chemistry*, 82(4), 583~591.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions:
Antioxidative activities of products of browning reaction
prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*,
44, 307~315.

Park, J. H., Kang, K. C., Baek, S. B., Lee, Y. H. and Rhee K. S.
1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine

algae, *Korean J. Food Sci. Technol.* 23, 256~261.

Pryce, R. J. 1972. Gallic acid as a natural inhibitor of flowering in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytochemistry*, 11(6), 1911~1918.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945~948.

Shon, M. Y., Choi, S. D., Kahng, G. G., Nam, S. H. and Sung, N. J. 2004. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 659~666.

Suh, K. H., Ahn, K. H., Lee, H. S., Lee, H. G., Cho J. K. and Hong, Y. K. 1999. Biosorption of Pb and Cr by using *Sargassum sagamianum*. *J. Koreman Fish. Soc.*, 32(4), 399~403.

Swain, T. and Hillis, W. E. 1959. The penolic constituents of *Prunus domestica*. *J. Sci. Rood Agric.*, 63~68.

Vinson JA. and Hontz B. A. 1984. Phenol antioxidative

index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric Food Chem.*, 43, 401~403.

Wieland, P., Ferran, S. R., Wilfried, D., Andreas, P., Irene, G., Diego, J., Rosa, L. R., Susana, B. and Carles, C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137~150.

Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and physics of lipids*, 45(2/4), 337~351.

徳田 廣，大野正夫，小川久明，1987，海藻資源養殖學．緑書房，pp. 37~66.

朴榮浩，張東錫，金善奉．1994．水産加工利用學．螢雪出版社．pp. 277~337.

감사의 글

어느덧 2년의 대학원 석사 과정을 마치면서 수고의 열매를 거두게 되어 하나님께 영광과 감사를 돌려 드립니다.

이 논문을 마치면서 수많은 도움과 조언, 격려와 위로를 아끼지 않으셨던 많은 분들이 떠오릅니다. 처음 하는 실험실 생활 가운데 많이 부족한 저를 지금까지 변함없는 애정으로 생각과 태도를 바로 잡아 주시고 학업을 성심성의껏 지도해 주신 안동현 교수님께 존경과 감사의 마음을 전합니다. 진심으로 감사합니다. 부족한 제 논문을 심사해 주신 김선봉 교수님과 전병수 교수님께도 감사를 드리며 바쁘신 와중에도 가르침을 주신 이근태 교수님, 조영제 교수님, 양지영 교수님 이양봉 교수님께도 감사를 드립니다. 구조 분석 실험을 성의껏 가르쳐 주시고 도와주신 생물공학과 강세은님과 조지영님에게도 진심으로 감사합니다.

2년이라는 짧은 시간이지만 그 동안의 실험실 생활이 저에게는 많은 것을 보고 배우며 알게 해주었습니다. 대학원 생활의 처음을 도와준 윤선경 선배님과 박진규 선배님, 나보다 실험실 생활을 먼저 시작하여 옆에서 잘 도와준 소영이, 동고동락하면서 많은 도움과 위로가 되어준 꽃봉우리, 유진, 아람, 진희, 원석, 창우, 미정, 경목, 주원, 지훈이에게 감사하며, 일과 학업에 최선을 다하는 모습으로 도전이 되어준 허종현 선배님, 정순아 선배님, 최미옥 선배님, 김봉두 선배님에게도 감사를 드립니다. 그리고 항상 옆에서 위로와 격려로 힘이 되어준 정은이와 대학원 생활을 같이 하면서 도와준 윤주언니, 성희언니, 진욱선배, 권혁선배, 선미언니 유진이에게도 감사를 드립니다.

제 인생에 가장 든든한 버팀목이 되어 주시는 사랑하는 아버지 어머니, 오랜 기간 학업에 열중 할 수 있도록 믿어주시고 후원해주신 부모님께 고개 숙여 감사의 마음을 전하며 이 논문을 바칩니다.

다시 한 번 논문이 완성되도록 많은 도움을 주신 모든 분들께 감사를 드립니다. 모든 분들의 삶에 하나님의 축복이 가득하길 바라며 논문을 마칩니다.