

해양조류 14종 유래 Marine Pectin의 추출 및 이의 함량과 항산화 활성에 관한 연구

이경아^{1,2} · 최운용¹ · 박건후^{1,3} · 정윤식¹ · 박아름이¹ · 이연지¹ · 강도형^{1,2}

¹한국해양과학기술원 제주특성연구센터

²과학기술연합대학원대학교

³뉴욕의과대학

Study on Marine Pectin Extraction and Its Antioxidant Activities from 14 Marine Algae under Different Extraction Solvents

Kyoung-Ah Lee^{1,2}, Woon Yong Choi¹, Gun-Hoo Park^{1,3}, Younsik Jeong¹,
Areumi Park¹, Yeonji Lee¹, and Do-Hyung Kang^{1,2}

¹Jeju Marine Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST)

²Department of Ocean Science, University of Science and Technology (UST)

³Department of Cell Biology and Anatomy, New York Medical College

ABSTRACT Pectin, one of the most complex polysaccharides in plant cell walls, consists of a galacturonic acid polymer as a backbone and neutral sugars chained on branches. This pectin is mainly a land-derived pectin and has been reported to have various beneficial effects such as removal of heavy metals, antioxidant activity, and anticancer activity, but pectin derived from marine algae is rarely studied and not used industrially. The aim of this study was to investigate the possibility of a new biomaterial from algal carbohydrates, a marine algae-derived pectin (i.e. marine pectin, MP), in five and nine species of micro- and macroalgae, respectively. MP extraction yields were higher in the distilled water (DW) extracts of *Spirulina maxima* and *Ulva pertusa* (yield extractions of 21.90±1.12% and 18.80±0.97%, respectively). These results confirm that a large amount of MP was extracted by DW from marine algae, and MP is unlike the pectin derived from land plants. The MP extraction conditions were established using different solvents for each marine algae, and optimum extraction conditions exist for each species. Regarding biological activity, the MPs from *Ecklonia cava* and *Sargassum horneri* showed 99% ABTS radical scavenging activity, and the Fe²⁺ chelating activity of the MP from *Dunaliella* sp. was confirmed to be higher than those of other MPs. These results would be useful and affordable for the development and use of functional materials of DW to reduce environmental pollution and facilitate industrialization.

Key words: marine pectin, marine algae, uronic acid, antioxidant activities, Korea

서 론

국내 해조류는 약 500여 종 이상이 알려져 있으며, 오래 전부터 식용으로 이용하고 있으나 육상생물에 비해 광범위하게 연구되지 못하였다(Kim 등, 2013). 최근 들어 세계적으로 해조류의 영양성분이 주목받아 C-phyococyanin, chlorophyll 등의 천연 색소나 폴리페놀(polyphenol) 등의 천연 생리활성 물질을 대상으로 각종 건강식품, 의료소재 및 의약

품 등 다양한 분야에 활용되고 있다(Kay, 1991; Yang 등, 1997; Choi 등, 1999). 하지만 해조류의 생리활성 물질에 비해 탄수화물 등의 다당류를 이용한 연구는 현재 미비한 실정이다(Kim 등, 2013; Kay, 1991; Yang 등, 1997; Choi 등, 1999; Kim과 Kim, 1998; Nagayama 등, 2002). 이러한 해조류 중 미세조류의 경우 탄수화물의 함량은 약 10~50%, 대형조류의 경우 40~65%의 함량으로 종마다 많은 차이가 나타나는 것으로 보고된다(Shekharam 등, 1987; Cheng 등, 2015; Usov 등, 2001; Chen 등, 2013). 이러한 해조 다당류(polysaccharide)로 알긴산(alginic acid), 푸코이단(fucoidan) 및 카라기난(carrageenan) 등이 알려져 있어 주로 연구되고 있으나 해조류에서 유래된 펙틴의 경우 거의 연구되어 있지 않은 실정이다(Kay, 1991; Yang 등, 1997; Choi 등, 1999; Kim과 Kim, 1998; Nagayama 등, 2002).

Received 3 April 2020; Accepted 18 May 2020

Corresponding author: Do-Hyung Kang, Ph.D. Jeju Marine Research Center, Korea Institute of Ocean Science and Technology (KIOST), Jeju 63349, Korea

E-mail: dohkang@kiost.ac.kr, Phone: +82-64-798-6100

Author information: Kyoung-Ah Lee (Graduate student), Do-Hyung Kang (Professor)

펙틴(pectin)은 주로 사과나 감귤류 등 육상식물에서 추출하며 시트러스 계열의 과피에 고온의 산을 처리하여 추출하는 것이 일반적이며, 이들 펙틴은 주로 high methoxyl pectin으로 알려져 있다(May, 1990). 또한 펙틴은 다당체의 일종으로 식물의 세포벽이나 세포 사이의 중간층을 구성하는 성분으로 세포의 골격을 유지하는 기능을 하며, galacturonic acid를 주축으로 하는 일렬로 연결된 사슬 골격을 중심으로 다양한 중성당이 가지 모양으로 연결된 복잡한 구조를 이루고 있다(Ilker와 Szczesniak, 1990; Ovodov, 2009). 육상식물 유래 펙틴은 galacturonic acid만으로 구성되어 있거나 rhamnose와 galacturonan이 번갈아 일렬로 구성되어 있는지에 따라 각각 homogalacturonan과 rhamnogalacturonan 두 종류로 구분되며, 주 골격 부분의 rhamnose 함량에 따라 펙틴 구조에 유연성이 달라지는 것으로 알려져 있다(Rees와 Wight, 1971). 이러한 펙틴은 산성화 조건에서 당과 결합하여 겔화되는 특유의 성질을 가지고 있어 식품 안정제, 겔화제 및 점증제 등으로 사용되어 왔다(Garnier 등, 1993). 특히 Bindels 등(2015)의 연구에 따르면 nondigestible carbohydrates의 종류인 펙틴은 pre-biotics 후보군으로 중요한 연구 대상이 될 것이라는 전망과 함께 연구의 필요성이 더욱 중요해지고 있는 실정이다.

기존의 육상 유래 펙틴은 우리나라의 지리적 특성상 좁은 육지영토와 부족한 자원으로 인해 시장성에서 한계를 보이지만 넓은 해양면적과 자원을 이용한 해양 유래 펙틴은 육상 자원에 비해 비교적 개발하기 적합한 환경을 보유하고 있어 해조류 유래 펙틴의 개발이 필요한 실정이다(Hwang 등, 1993). 특히 해조류는 종마다 다른 종류의 uronic acid와 중성당이 포함되어 있다고 알려져 있어 기존 육상 유래 펙틴과 다른 형태의 새로운 펙틴류의 개발이 가능할 것으로 기대된다(Cunha와 Grenh, 2016; Deniaud-Bouët 등, 2017; Li 등, 2008). 이에 펙틴의 추출은 대한민국 식품의약품안전처와 미국 FDA에 고시되어 있는 방법을 바탕으로 실험을 진행하여 육상식물 유래 펙틴과 비교할 수 있는 기초자료를 처음으로 확보하였다. 이를 통해 현재 육상식물 유래 펙틴 추출 방법이 해양 펙틴 추출방법에 적용 가능한지 판단하여 후속 연구를 위한 기초자료로 제시하고자 한다. 또한 다양한 추출 용매를 활용하여 산업화에 효율적인 펙틴 추출 방법을 확립하고 항산화 활성을 탐색하는 과정을 통해 건강기능식품으로써의 적용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

해양조류 채집 및 가공

본 실험에서 사용된 대형해조류 중 모자반(*Sargassum fulvellum*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Saccharina japonica*), 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 및 톳(*Sargassum fusiforme*) 5종은 제주에서 시판되는 상품을 구입하였으며, 감태(*Ecklonia cava*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*)

는 제주 동부 행원리 지역에서 채집한 것을 어촌계로부터 양도받았다. 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)와 팽생이모자반(*Sargassum horneri*)은 각각 제주 인근 성산 해역과 협재 해역에서 채취하였다. 미세조류 중 클로렐라(*Chlorella* sp.)는 (주)클로랜드(Geojje, Korea)의 시판 제품을 받아 사용하였으며, 스피루리나(*Spirulina maxima*), 랩토링비아 KIOST-1(*Leptolyngbya* sp. KIOST-1)은 한국해양과학기술원 제주연구소에서 자체 생산한 분말을 사용하였다. 테트라셀 미스(*Tetraselmis* sp.)는 인하대학교 미세조류 해양바이오 디젤 연구센터로부터 분양받았으며 두나리엘라(*Dunaliella* sp.)는 한국해양과학기술원 해양시료도서관에서 분양받아 실험실에서 배양한 분말을 사용하였다. 모든 해조류는 증류수로 5회 이상 세척하여 염분을 제거한 후 동결건조기(FDTA-45, OPERON, Gimpo, Korea)에서 72시간 동안 동결건조한 다음 막자사발을 이용해 잘게 분쇄하여 실험에 이용하였다.

해양조류 유래 marine pectin 추출

동결건조 후 분쇄된 시료 2 g에 용매를 1:20(w/w) 비율로 혼합하여 추출을 진행하였다. 추출에 사용된 용매는 증류수와 탈염 과정을 거친 탈염수, 일반적으로 펙틴 추출에 널리 이용되는 산성 용매인 hydrochloric acid와 citric acid를 각각 증류수에 희석하여 pH 1.5, pH 2.5의 농도로 맞추어 총 6종류의 용매를 이용하였다(May, 1990; Park 등, 2001; Lee, 2019). 용매와 혼합 후 sonicator(Powersonic 420, Hwashin Tech, Seoul, Korea)에서 1시간 동안 파쇄한 다음 95°C waterbath(JSWB-11T, JSR, Tokyo, Japan)에서 1시간 동안 가열한 후 원심분리기(1736R, Labogene, Lillerød, Danmark)를 이용하여 20분간 9,000 rpm으로 상등액과 침전물을 분리하였다. 상등액은 filter(Filter paper grade 4, Whatman, Maidstone, UK)를 이용하여 여과한 후 상등액 용량 3배의 95% 에탄올을 주입하여 4°C에서 12시간 동안 침전시켰다. 침전된 펙틴은 원심분리기(1736 R, Labogene)를 이용하여 9,000 rpm에서 20분간 분리한 후 95% 에탄올을 이용하여 3회 세척한 다음 50°C 오븐(VS-1202D3, Vision Scientific, Daejeon, Korea)에서 72시간 건조하였으며, 얻어진 최종 시료를 실험에 사용하였다(May, 1990; Park 등, 2001; Lee, 2019).

해양조류 유래 marine pectin의 순도 분석

해양조류 유래 펙틴의 순도를 측정하기 위해 기본 골격을 이루고 있는 galacturonic acid 함량을 분석하였으며, m-hydroxydiphenyl법을 수정하여 실험하였다(Park 등, 2001; Lee, 2019; Blumenkrantz와 Asboe-Hansen, 1973). 증류수에 0.1%(w/v) 농도로 용해한 시료 100 µL에 sulfamic acid 및 potassium hydroxide를 혼합한 4 M sulfamic acid/potassium sulfate solution 10 µL와 sodium tetraborate 및 sulphuric acid를 혼합한 75 mM sodium tetraborate/sul-

furic acid solution 625 μ L를 첨가한 후 vortexing 하여 100°C에서 15분간 반응시켰다. 얼음으로 냉각시킨 후 0.15 % 3-phenylphenol(w/v) in 0.5% NaOH(w/v) 20 μ L를 주입하여 3분간 반응시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 525 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 D-galacturonic acid(48280, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하였다(Park 등, 2001; Lee, 2019; Blumenkrantz와 Asboe-Hansen, 1973).

해양조류 유래 marine pectin의 ABTS 라디칼 소거 활성 분석

해양조류 유래 펙틴의 항산화 능력 측정은 ABTS cation decolourisation assay 방법을 이용하여 진행하였다(Lee, 2019; Re 등, 1999). 7.4 mM의 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, 11684302001, Sigma-Aldrich Co.)와 2.6 mM potassium persulfate (216224, Sigma-Aldrich Co.)를 1:1(v/v)로 혼합하여 실온 조건의 암실에서 24시간 반응시켜 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 증류수를 사용하여 희석하였다. 희석이 완료된 용액 190 μ L에 증류수 0.1%(w/v)로 희석한 시료 10 μ L를 가하여 암실에서 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 ascorbic acid(A1300000, Sigma-Aldrich Co.)를 이용했으며 ABTS 라디칼 소거 활성 계산식은 다음과 같다(Lee, 2019; Re 등 1999).

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{[(\text{Control} - \text{Sample}) / \text{Control}] \times 100}{1}$$

해양조류 유래 marine pectin의 Fe^{2+} chelating activity 분석

해양조류 유래 펙틴의 Fe^{2+} chelating activity를 분석하기 위하여 Ferrozine 방법을 이용하여 철 이온 흡착 능력(ferrous ion chelating activity; FICA)을 확인하였다(Lee, 2019; McGown 등, 1982; Dinis 등, 1994). 증류수에 해양 유래 펙틴 시료를 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1%(w/v)의 농도로 용해시킨 시료 100 μ L와 0.4 mM FeCl_2 15 μ L, 1 mM ferrozine 35 μ L를 96-well plate에 주입한 후 실온 암실에서 10분간 반응시킨 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 Na_2EDTA 를 사용하였다. 철 이온 흡착 제거 활성 계산식은 다음과 같다(Lee, 2019; McGown 등, 1982; Dinis 등, 1994).

$$\text{FICA (\%)} = \frac{[(\text{Control} - \text{Sample}) / \text{Control}] \times 100}{1}$$

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하였으며, 그 평균값은 Graph Pad(ver. 7, GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 각 항목에 따라 two-way ANOVA에 의해 신뢰수준 95%($P < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결과 및 고찰

해양조류별 marine pectin의 추출 특성

실험에 사용된 해양조류는 미세조류 5종과 대형해조류 9종으로 총 14종이 선정되었으며, 이들의 해양조류 유래 펙틴의 추출 수율을 분석하였다. Fig. 1은 5종의 미세조류에서 각각 펙틴을 추출한 결과이며, 추출용매에 따라 추출 효율이 상이한 것을 확인할 수 있었다. *Chlorella* sp.의 경우 모든 추출 조건에서 약 3~6%대의 낮은 추출 수율을 나타내는 것을 확인하였다. 이는 *Chlorella* 특유의 두꺼운 세포벽과 hemicellulose 계열 및 rigid wall의 함량이 높아 세포가 비교적 단단하기 때문에 추출이 용이하지 않은 것으로 사료된다(Yap 등, 2016; Abo-Shady 등, 1993). 또한 *Dunaliella* sp.의 경우 모든 용매에서 약 13~15%의 추출 수율을 보이지만 HCl 1.5 용매에서 $1.45 \pm 0.17\%$ 로 낮은 수율을 나타낸 것을 확인할 수 있었으며, *Leptolyngbya* sp.의 경우도 HCl 1.5 용매에서 약 $3.21 \pm 0.19\%$ 로 가장 낮은 수율을 보인 것을 제외하고 유의적인 결과를 얻지 못하였다. 반면 *Tetraselmis* sp.의 경우 산성 용매에서 증류수의 3~9배가량 증가한 추출 수율을 나타냈다. 특히 HCl과 citric acid(CA) 모두 pH2.5 용매에서 가장 높은 수율을 나타냈으며, HCl과 CA에서 각각 $22.23 \pm 1.90\%$ 와 $26.37 \pm 1.41\%$ 의 추출 수율을 나타냈다. 이는 *Tetraselmis* sp.의 경우 세포벽의 주성분이 keto-sugar acids 3-deoxy-manno-2-octulosonic acid와 galacturonic acid 등의 산성다당체로 주로 구성되어 있다고 알려져 있어 산성 조건하에서 추출 수율이 높아진 것으로 판단된다(Becker 등, 1998). 또한 특이적으로 *S. maxima*의 경우 증류수 조건과 산성 조건 모두 높은 펙틴 추출 수율을 보였으며, 산성 조건보다 증류수에서 $21.90 \pm 1.13\%$ 로 더 높은 펙틴 추출 수율을 나타내었다. 이는 *Spirulina*의 polysaccharide 성분 특성에 따른 것으로 water-soluble polysaccharide 성분이 38.3~60.0%가량 포함되어 있으며, 동시에 acid-soluble polysaccharide 성분도 79.9% 정도 포함되어 있다고 알려져 있기 때문인 것으로 사료된다(Shekharam 등, 1987). 또한 uronic acid의 함량이 9.1~9.5% 정도 함유되어 있기 때문에 펙틴 추출에 매우 용이한 종인 것으로 사료된다(Shekharam 등, 1987). 과피가 산성인 육상식물과 비교하여 유자박과 Galgal peel(*Citrus pseudomon* Tan.)을 0.1 N HCl을 사용하여 추출한 경우 각각 8.6~17.7%와 15.26%, 사과박을 0.05 N HCl을 사용하여 추출한 경우 8%의 추출 수율이 보고되었으며, 이는 *Chlorella* sp.를 제외한 네 종의 미세조류를 산성 조건으로 추출한 경우와 대체로 유사한 경향을 보이거나 비교적 높은 수율을 나타냈다(May, 1990; Park 등, 2001; Attri와 Maini, 1996; Lee 등, 1999). 특히 *S. maxima*는 증류수 추출 조건에서 펙틴 추출 수율이 높은 장점이 있어서 상황에 따라 산업적으로 이용할 경우 더욱 쉽게 접근할 수 있는 가능성이 있을 것으로 사료된다.

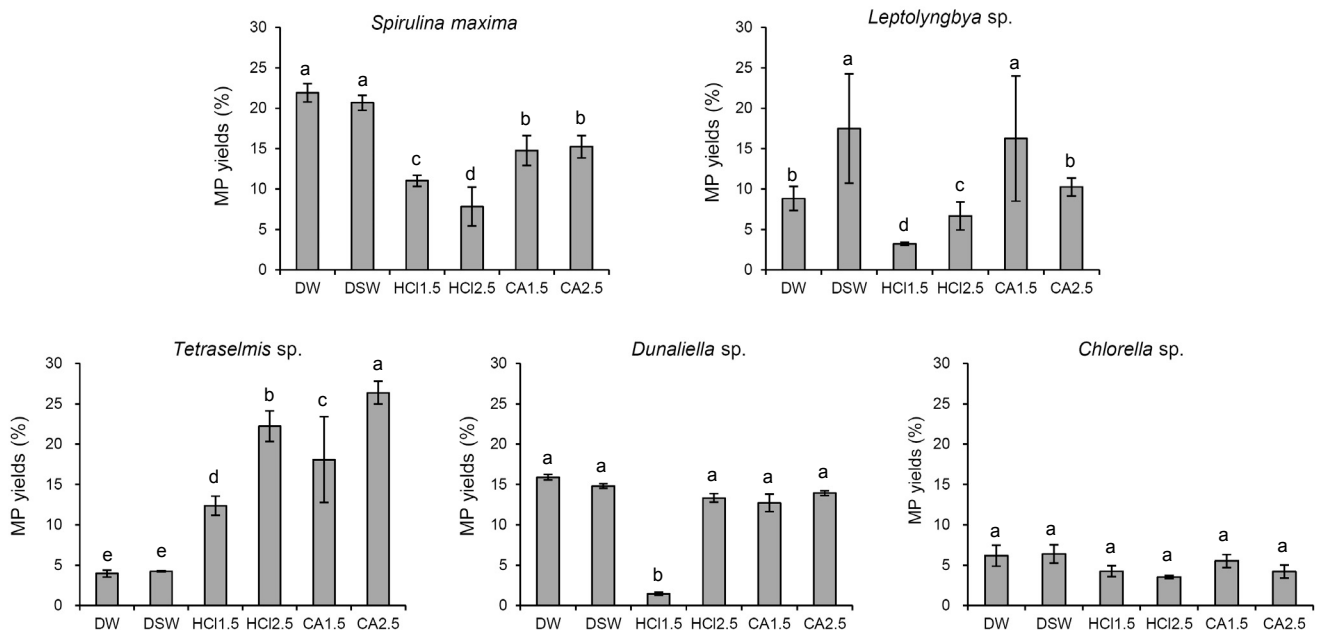


Fig. 1. Comparison of marine pectin (MP) extraction yields of 5 species of microalgae according to extraction solvent. DW, distilled water; DSW, desaline water; HCL1.5, sulfuric acid at pH 1.5; HCL2.5, sulfuric acid at pH 2.5; CA1.5, citric acid at pH 1.5; CA2.5, citric acid at pH 2.5. Different letters (a-e) above the bars indicate a significant difference (at $P < 0.05$) among the same sample groups.

대형해조류 9종에 대한 6가지 용매를 이용해 펙틴을 추출하고 수율을 비교한 결과를 Fig. 2에 나타냈으며 각각의 조류와 추출 용매에 따라 모두 상이한 결과를 나타냈다. 9종의 대형해조류 중 녹조류인 *U. pertusa*가 대부분의 추출 용매 조건에서 전체적으로 높은 추출 수율을 나타내는 것을 확인하였고 증류수에서 $18.80 \pm 0.25\%$ 로 가장 높은 수율을 보였다. 또한 모자반(*S. fulvellum*)은 전체적으로 모든 용매에서 약 7~12%의 준수한 추출 수율을 나타내는 것을 확인하였다. 반면 갈조류 중 다시마(*S. japonica*), 팽새이모자반(*S. horneri*), 툇(*S. fusiforme*) 및 감태(*E. cava*)는 전체적으로 추출 수율이 매우 낮게 얻어진 것을 확인하였으며, 꼬시래기(*G. verrucosa*)는 pH 2.5 조건에서 특징적으로 매우 높은 펙틴 추출 수율을 나타내는 것을 확인하였다. 미역(*U. pinnatifida*)의 경우 산성 용매에서는 에탄올 침전이 이루어지지 않아 펙틴 함량을 측정할 수 없었으며, 우뚝가사리(*G. amansii*)의 경우 증류수 용매에서 겔화되어 펙틴을 분리할 수 없었다.

갈조류(*S. japonica*, *S. fulvellum*, *S. fusiforme*, *E. cava*, *S. horneri*, *U. pinnatifida*)의 경우 alginic acid가 다량 함유되어 있으며, 일반적으로 염기성의 Na_2CO_3 나 NaOH 로 추출한다(Park 등, 2012). 따라서 펙틴 추출을 위한 원료가 갈조류의 경우 산성-약산성 또는 중성의 조건에서 전체적으로 원활한 추출이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이와 반대로 홍조류(*Gracilaria*, *Gelidium*)는 주요 성분이 agarose 또는 agaropectin으로 알려져 있으며, agaropectin은 황산기나 urone기를 가지고 있는 산성다당체로 구성되어

있기 때문에 산성 조건에서 펙틴의 추출 수율이 더 높은 것으로 사료된다(Tsuchiya와 Hong, 1965). 흥미롭게도 녹조류인 *U. pertusa*는 ulvan이라는 주요 sulfated polysaccharides를 함유하고 있는데, 이는 낮은 pH 2~4.5 조건과 80~90°C의 수용액 조건에서 추출이 용이하다고 알려져 있다(Kidgell 등, 2019). 이러한 *U. pertusa*는 거의 모든 조건에서 펙틴의 추출이 용이한 것을 확인하여 산업적으로 이용 가치가 높은 것을 확인하였다.

해양조류별 marine pectin 내 구성 및 순도

해양조류 유래 펙틴의 특성을 확인하기 위해 펙틴의 기본 골격을 이루고 있는 galacturonic acid의 함량을 분석하였다. Table 1에 각각 해양조류에 따른 galacturonic acid의 함량 분석 결과를 나타내었다. 미세조류 5종 중 *Tetraselmis* sp.는 모든 용매에서 10% 이상의 galacturonic acid 함량을 나타냈으며, 그중 탈염수 추출에서 $13.10 \pm 1.39\%$ 로 가장 높은 함량을 나타냈다. 또한 *Dunaliella* sp.는 특이적으로 HCL1.5 조건에서 galacturonic acid 함량이 $28.11 \pm 2.08\%$ 로 가장 높게 나타나는 것을 확인했지만, 펙틴 추출 수율이 가장 적기 때문에 유의미한 결과를 얻을 수 없었다. 또한 모든 미세조류에서 10% 이하의 낮은 galacturonic acid 함량을 얻은 것을 확인하였다. 거대 조류에서 추출한 펙틴의 galacturonic acid 함량을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었으며, 전반적으로 미세조류보다 높은 함량을 가진 것을 확인할 수 있었다. 갈조류인 *S. japonica*, *S. fulvellum*, *S. fusiforme* 및 *E. cava*는 약 30~60%의 높은 galactur-

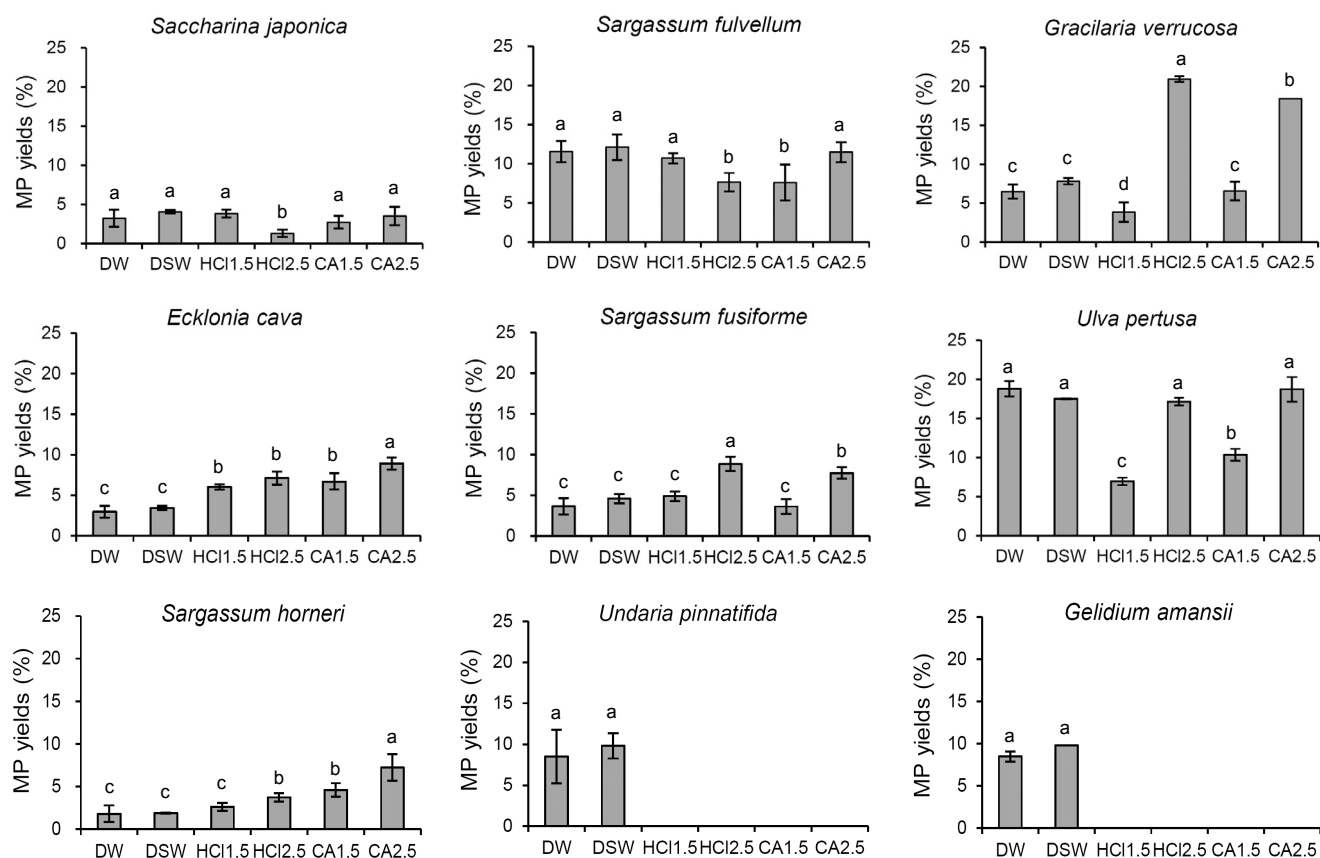


Fig. 2. Comparison of marine pectin (MP) extraction yields of 9 species of macroalgae according to extraction solvent. DW, distilled water; DSW, desaline water; HCL1.5, sulfuric acid at pH 1.5; HCL2.5, sulfuric acid at pH 2.5; CA1.5, citric acid at pH 1.5; CA2.5, citric acid at pH 2.5. Different letters (a-d) above the bars indicate a significant difference (at $P < 0.05$) among the same sample groups.

Table 1. Comparison of galacturonic acid content of marine pectin from marine algae according to extraction solvent

		Galacturonic acid content (%)					
		DW ¹⁾	DSW ²⁾	HCL1.5 ³⁾	HCL2.5 ⁴⁾	CA1.5 ⁵⁾	CA2.5 ⁶⁾
Microalgae	<i>Spirulina maxima</i>	5.26±1.12 ^c	5.51±0.73 ^c	8.66±1.06 ^a	7.98±0.64 ^b	7.69±1.39 ^b	6.01±0.38 ^c
	<i>Leptolyngbya</i> sp.	3.71±1.44 ^a	1.66±0.33 ^c	2.27±0.55 ^c	3.70±0.49 ^a	2.48±0.80 ^b	3.36±1.17 ^a
	<i>Tetraselmis</i> sp.	12.92±0.61 ^a	13.10±1.39 ^a	10.60±0.49 ^c	12.43±0.64 ^a	10.80±0.76 ^c	11.63±0.43 ^b
	<i>Dunaliella</i> sp.	9.72±0.94 ^b	8.40±1.68 ^c	28.11±2.08 ^a	6.95±1.16 ^c	7.57±0.83 ^d	6.65±1.80 ^c
	<i>Chlorella</i> sp.	1.24±0.35 ^a	1.06±0.54 ^a	1.59±0.57 ^a	1.78±0.54 ^a	1.29±0.21 ^a	1.63±0.42 ^a
Macroalgae	<i>Saccharina japonica</i>	28.52±4.30 ^e	36.33±10.27 ^d	49.70±0.47 ^a	45.60±4.06 ^b	35.73±4.29 ^d	41.14±2.71 ^c
	<i>Sargassum fulvellum</i>	47.99±7.78 ^d	51.35±1.30 ^c	62.62±3.53 ^a	61.01±2.60 ^b	40.76±0.68 ^c	51.07±4.55 ^c
	<i>Undaria pinnatifida</i>	63.46±3.53 ^a	25.88±1.91 ^b	—	—	—	—
	<i>Ecklonia cava</i>	29.42±1.87 ^e	29.61±2.90 ^e	48.78±5.59 ^a	41.18±3.68 ^b	39.24±1.94 ^c	31.19±2.75 ^d
	<i>Gracilaria verrucosa</i>	7.72±1.30 ^c	8.53±0.71 ^c	9.90±0.67 ^a	6.44±0.31 ^d	9.07±1.35 ^b	7.78±0.72 ^c
	<i>Gelidium amansii</i>	—	4.74±0.07 ^c	12.51±0.21 ^a	7.81±1.51 ^b	10.78±0.79 ^a	11.33±1.26 ^a
	<i>Sargassum fusiforme</i>	54.78±4.67 ^b	13.92±1.17 ^f	49.02±3.60 ^c	62.07±2.18 ^a	33.63±1.26 ^c	46.36±4.11 ^d
	<i>Ulva pertusa</i>	36.23±7.19 ^d	42.62±4.32 ^c	26.48±3.69 ^f	61.98±10.17 ^a	30.10±10.41 ^e	47.71±7.19 ^b
	<i>Sargassum horneri</i>	5.92±1.60 ^c	6.27±1.18 ^c	11.76±3.29 ^b	12.42±0.26 ^a	10.26±0.35 ^b	11.66±0.96 ^b

¹⁾Distilled water. ²⁾Desaline water. ³⁾Hydrochloric acid at pH 1.5. ⁴⁾Hydrochloric acid at pH 2.5. ⁵⁾Citric acid at pH 1.5. ⁶⁾Citric acid at pH 2.5.

Different lowercase letters (a-f) within a row indicate a significant difference (at $P < 0.05$) among the same sample groups.

onic acid 함량을 가진 것으로 나타났으며, *U. pinnatifida*의 경우 증류수로 추출한 조건에서 약 63.46±3.53%의 함량으로 가장 높은 galacturonic acid 함량을 나타냈다. 반면 특이

적으로 갈조류인 *S. horneri*의 경우 다른 갈조류와는 다르게 10%대의 낮은 galacturonic acid 함량을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 녹조류인 *U. pertusa*는 갈조류와 비슷한 수

준의 galacturonic acid 함량을 보이는 것을 확인하였지만, 홍조류인 *G. verrucosa*와 *G. amansii*는 다른 갈조류나 녹조류에서 추출한 펙틴에 비해 10% 이하의 낮은 galacturonic acid 함량을 나타내는 것을 확인하였다.

갈조류에서 galacturonic acid 함량이 높은 것은 갈조류의 polysaccharides가 주로 alginic acid로 존재하는데 이들의 주성분이 mannuronic acid와 glucuronic acid(GlcA)로 다른 종에 비해 다량의 uronic acid가 함유되어 있다고 알려져 있다(Usov 등, 2001; Deniaud-Bouët 등, 2017). 이러한 다량의 uronic acid가 존재하면 기존에 사용하던 m-hydroxydiphenyl법에 따라 galacturonic acid 이외의 uronic acid류의 다당체 분석이 동시에 진행되기 때문에 높은 순도의 galacturonic acid가 측정된 것으로 사료된다(Usov 등, 2001; Deniaud-Bouët 등, 2017; Kidgell 등, 2019). 또한 녹조류인 *U. pertusa*는 ulvan이라는 주요 성분이 GlcA와 iduronic acid의 uronic acid류로 구성되어 있어 함량이 높게 나온 것으로 사료된다(Kidgell 등, 2019). 반면 홍조류인 *G. verrucosa*와 *G. amansii*는 agarose 또는 agaropectin이 주성분으로 알려져 있어 galacturonic acid의 함량이 매우 낮은 것을 확인하였다(Renn, 1997).

상기의 실험 결과 기존 육상식물 유래 펙틴의 경우 60% 이상의 성분이 galacturonic acid이기 때문에 펙틴의 순도를 galacturonic acid의 함유량으로 결정하지만, 해양조류 유래 펙틴은 주요 backbone이 되는 구조가 uronic acids(mannuronic acid, GlcA, iduronic acid 등)로 구성되어 있기 때문에 galacturonic acid가 아닌 total uronic acids의 함유량으로 순도를 측정하는 것이 더 적합한 것으로 사료된다(Usov 등, 2001; Deniaud-Bouët 등, 2017; Kidgell 등, 2019). 이에 본 연구 논문에서는 통상적인 펙틴 순도 분석방법인 galacturonic acid 함유량을 분석하였지만, 차후 해양조류 유래 펙틴을 이용한 연구에서는 galacturonic acid와 함께 total uronic acids 함유량을 동시에 분석하는 것이 타당

할 것으로 판단된다. 따라서 해양조류 유래 펙틴은 육상식물 유래 펙틴과 그 성질이 달라 marine pectin이라는 명칭을 이 연구 말미에 부여하여 서로 다른 성질을 구분하고자 정의하였으며, marine pectin은 현존하는 기존 펙틴 추출방법과 다르게 분류상 강(Order)에 속하는 종별로 추출방법을 선택할 필요성이 있다고 할 수 있다.

해양조류별 marine pectin의 항산화 활성

상기 얻어진 해양조류 유래 marine pectin은 기존 육상식물 유래 펙틴과 달리 증류수로 추출이 가능하여 고순도의 펙틴 추출이 가능한 것을 확인하였다. 이는 산성 물질을 사용하는 경우의 환경오염에 대한 부담을 대폭 낮출 수 있어 친환경적인 산업화에 장점이 있다. 따라서 각각의 해조류를 증류수로 추출한 marine pectin을 선별하여 항산화 활성 분석을 진행하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성과는 달리 유기용매에만 녹는 친수성 항산화 물질의 항산화 효과를 평가하는 단점을 극복하여, 유기용매는 물론 친수성 및 소수성 화합물의 항산화 활성을 모두 평가할 수 있는 장점을 가지고 있다(Arnao, 2000). 해양조류 유래 marine pectin의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3A에 따르면 모든 미세조류 유래 marine pectin 실험군에서 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그중 *Dunaliella* sp.가 10 mg/mL 농도에서 $91.45 \pm 1.33\%$ 로 가장 높은 활성을 나타내는 것을 확인했으며, *Chlorella* sp.가 가장 낮은 ABTS 라디칼 소거 활성을 보인 것을 확인하였다. 특히 *Dunaliella* sp.와 *Tetraselmis* sp. 유래 marine pectin은 남조류인 *S. maxima*와 *Leptolyngbya* sp. 유래 marine pectin보다 높은 ABTS 라디칼 소거 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 대형해조류 유래 marine pectin 실험군의 ABTS 라디칼 소거 활성 결과는 Fig. 3B에 나타내었다. 미세조류 유래 marine pectin과 다르게 대형해조류 유래

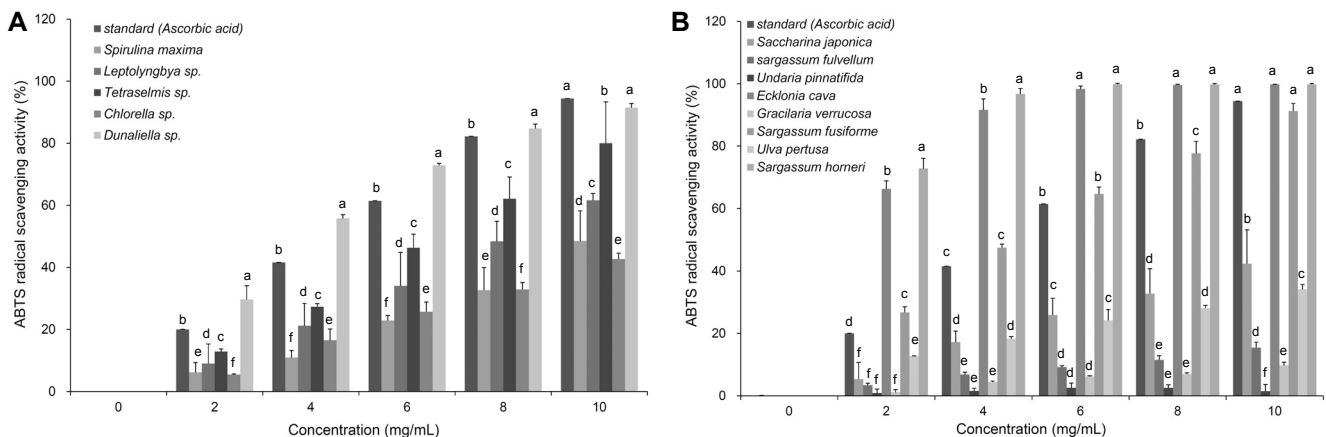


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity according to concentrations of marine pectin extracted from marine (A) microalgae and (B) macroalgae. Different letters (a-f) above the bars indicate a significant difference (at $P < 0.05$) among the same concentration groups.

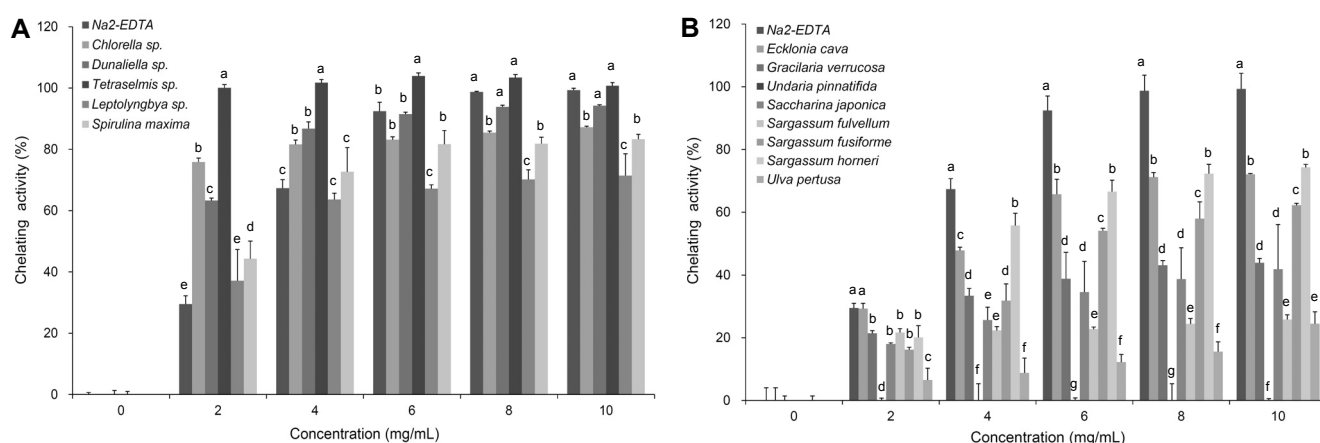


Fig. 4. Fe^{2+} chelating activity according to concentrations of marine pectin from marine (A) microalgae and (B) macroalgae. Different letters (a-g) above the bars indicate a significant difference (at $P < 0.05$) among the same concentration groups.

marine pectin에서는 종에 따라 상이한 효과가 나타났다.

홍조류인 *G. amansii*는 marine pectin을 추출하지 못했을 뿐만 아니라, *G. verrucosa*는 약 $9.81 \pm 0.93\%$ 의 낮은 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내어 전체적으로 항산화 효과가 낮은 것을 확인하였다. 특히적으로 갈조류는 종마다 다르게 극적으로 ABTS 라디칼 소거 활성이 다르게 나타나는 것을 확인하였다. 감태(*E. cava*)와 쎄생이모자반(*S. horneri*)은 10 mg/mL의 농도에서 각각 $99.84 \pm 0.23\%$ 와 $99.80 \pm 0.26\%$ 로 100%에 가까운 ABTS 라디칼 소거 활성이 확인되었고, 투여량이 4 mg/mL에서부터 100% 가까운 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 유사종인 모자반(*S. fulvellum*)도 최종 투여 농도인 10 mg/mL에서 약 $91.3 \pm 0.51\%$ 로 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 반면 다시마(*S. japonica*)는 ABTS 라디칼 소거 활성을 증가시키지 못하였으며, 미역(*U. pinnatifida*)은 약 $2.74 \pm 0.65\%$ 로 가장 낮은 ABTS 라디칼 소거 활성이 확인되었다. 구멍갈파래(*U. pertusa*)는 약 30%대의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타내어 갈조류보다 극적인 효과를 볼 수는 없었다.

철(Fe^{2+})과 같은 2가 금속이온은 세포 내 산화물 형성에 관여하여 지질 과산화를 촉진시키는데, 해양 유래 marine pectin을 처리하여 지질 과산화 억제 효과에 대해 Fe^{2+} chelating activity 분석을 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다(Haung 등, 2002). 미세조류 유래 marine pectin의 Fe^{2+} chelating activity를 확인한 결과를 Fig. 4A에 나타내었으며, 모든 실험군에서 70% 이상의 높은 흡착 능력을 확인할 수 있었다. 특히 *Tetraselmis* sp.의 경우 2 mg/mL의 낮은 농도에서도 100%의 활성을 나타냈으며, *Dunaliella* sp.와 *Chlorella* sp. 각각 $94.24 \pm 0.31\%$, $87.20 \pm 0.32\%$ 로 높은 Fe^{2+} chelating activity를 나타냈다. 대형해조류 유래 marine pectin의 Fe^{2+} chelating activity를 확인한 결과를 Fig. 4B에 나타내었으며, 상대적으로 미세조류 유래 marine pectin과 비교하여 전체적으로 70% 이하의 낮은

Fe^{2+} chelating activity를 나타내었고 종에 따라 다양한 결과가 나타났다. 그중 가장 높은 Fe^{2+} chelating activity를 가지는 실험군은 갈조류인 *S. horneri*와 *E. cava*가 10 mg/mL의 농도에서 각각 $74.29 \pm 0.94\%$ 와 $72.04 \pm 0.25\%$ 로 가장 높은 Fe^{2+} chelating activity를 나타냈다. 반면 나머지 실험군의 경우 종을 구분하지 않고 대체로 낮은 Fe^{2+} chelating activity를 가지는 것을 확인하였으며, *U. pinnatifida*는 Fe^{2+} chelating activity를 거의 가지고 있지 않은 것을 확인하였다.

상기 결과와 같이 ABTS 라디칼 소거 활성 및 Fe^{2+} chelating activity 등이 다른 이유는 각각의 해양조류 종마다 marine pectin을 구성하고 있는 backbone의 구성이 여러 가지 다당체(alginic acid, fucoidan, ulvan 등)로 이루어져 있고 그 성분이 mannose, xylose, galactose, fucose 및 GlcA 등의 여러 가지 당류로 구성되어 다양한 특성과 활성을 가지는 것으로 사료된다(Usuv 등, 2001; Deniaud-Bouët 등, 2017; Kidgell 등, 2019). 특히 기존 펙틴의 추출은 산성 조건에서 추출하는 화학적 방법에 의존하고 있으나 해양조류 유래 펙틴은 증류수로 고순도의 marine pectin을 얻어낼 수 있는 장점이 있다(May, 1990; Park 등, 2001). 따라서 해양조류 유래 marine pectin은 증류수를 통한 환경 친화적 추출 방법이 가능하여 육상식물에서 추출한 펙틴보다 경제성이 뛰어나고 환경오염을 줄일 수 있는 방법으로 사료된다. 또한 해양조류 특유의 고유 다당체 성분들로 인해 높은 항산화 활성을 보여 새로운 기능성 활용 가능성을 확인하였다.

요 약

본 연구는 해양조류 유래 marine pectin을 다양한 용매 조건에서 추출하고 항산화 활성 연구를 진행하였다. 본 연구를 통해 육상 유래 원료는 산성 조건(HCl, citric acid)에서 펙틴을 추출해야 하지만 해양조류 유래 펙틴은 증류수로 추출해도 고순도의 marine pectin을 얻어낼 수 있는 것을 처음

으로 확인하였고, 식품의약품안전처의 용매 사용 가이드라인에도 적합한 것을 확인하였다. 특히 미세조류에서는 스피루리나(*Spirulina maxima*), 대형해조류에서는 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)와 증류수 조건에서 추출하기 유리한 결과를 도출하였다. 이를 통해 기존 육상 유래 원료를 통해 펙틴을 생산할 때 발생하는 환경오염의 문제를 줄일 수 있고 산업적으로 이용 가능성이 높다는 장점이 있는 것을 확인하였다. 또한 해조류 중에 따른 적합한 marine pectin 추출 방법의 확립 및 이들 해조류에서 추출한 marine pectin은 순도가 결정되는 산성다당체의 종류가 기존 펙틴과 같은 galacturonic acid가 아닌 수종의 uronic acid류가 주요 성분으로 되어 있기 때문에 정확한 조성을 파악하기 위해서는 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서 이 연구는 해양조류 유래 marine pectin은 비교적 높은 항산화 효과를 보이는 것을 확인하였고, 해양조류가 함유하고 있는 탄수화물 화합물의 새로운 활용 가능성에 대한 기초자료를 확보하는 데 그 의의가 있다.

감사의 글

이 논문은 한국해양과학기술원 기관고유과제(PE99621, PE99722)의 재원으로 해양생물·유전자원 활용 기술개발 사업의 지원을 받아 수행된 연구이며, 한국해양과학기술원 제주연구소 연구진들의 과제 수행 노력에 심심한 사의를 표합니다.

REFERENCES

- Abo-Shady AM, Mohamed YA, Lasheen T. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biol Plant*. 1993. 35:629-632.
- Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci Technol*. 2000. 11:419-421.
- Attri BL, Maini SB. Pectin from galgal (*Citrus pseudolimon* Tan.) peel. *Bioresour Technol*. 1996. 55:89-91.
- Becker B, Melkonian M, Kamerling JP. The cell wall (theca) of *Tetraselmis striata* (chlorophyta): Macromolecular composition and structural elements of the complex polysaccharides. *J Phycol*. 1998. 34:779-787.
- Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015. 12:303-310.
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem*. 1973. 54:484-489.
- Chen CY, Zhao XQ, Yen HW, Ho SH, Cheng CL, Lee DJ, et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem Eng J*. 2013. 78:1-10.
- Cheng YS, Labavitch JM, VanderGheynst JS. Elevated CO₂ concentration impacts cell wall polysaccharide composition of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Lett Appl Microbiol*. 2015. 60:1-7.
- Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Koo JG. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on the attack of oxygen radicals in kidney. *J Korean Fish Soc*. 1999. 32:758-763.
- Cunha L, Grenh A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar Drugs*. 2016. 14:42. doi: 10.3390/md14030042.
- Deniaud-Bouët E, Hardouin K, Potin P, Kloareg B, Hervé C. A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydr Polym*. 2017. 175:395-408.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*. 1994. 315:161-169.
- Garnier C, Axelos MAV, Thibault JF. Phase diagrams of pectin-calcium systems: Influence of pH, ionic strength, and temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation. *Carbohydr Res*. 1993. 240:219-232.
- Huang X, Dai J, Fournier J, Ali AM, Zhang Q, Frenkel K. Ferrous ion autooxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radic Biol Med*. 2002. 32:84-92.
- Hwang J, Pyun YR, Kokini JL. Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. *Food Hydrocoll*. 1993. 7:39-53.
- Ilker R, Szczesniak AS. Structural and chemical bases for texture of plant foodstuffs. *J Texture Stud*. 1990. 21:1-36.
- Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1991. 30:555-573.
- Kidgell JJT, Magnusson M, Nys R, Glasson CRK. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Res*. 2019. 39:101422. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101422>
- Kim D, Park J, Lee TK. Analysis of biochemical compositions and nutritive values of six species of seaweed. *J Life Sci*. 2013. 23:1004-1009.
- Kim HS, Kim GJ. Effects of the feeding *Hijikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1998. 27: 718-723.
- Lee K. A study of characteristics of pectin-like polysaccharide extracted from marine algae. Master's thesis. University of Science and Technology, Jeju, Korea. 2019.
- Lee SC, Yuk HG, Bae SM, Hwang YI, Choi JS, Cho YJ. Extraction of pectin with exo-polygalacturonase from apple pomace. *Korean J Food Sci Technol*. 1999. 31:68-73.
- Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*. 2008. 13:1671-1695.
- May CD. Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydr Polym*. 1990. 12:79-99.
- McGown EL, Rusnak MG, Lewis CM, Tillotson JA. Tissue ascorbic acid analysis using ferrozine compared with the dinitrophenylhydrazine method. *Anal Biochem*. 1982. 119:55-61.
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemother*. 2002. 50:889-893.
- Ovodov YS. Current views on pectin substances. *Russ J Bioorg Chem*. 2009. 35:269-284.
- Park EY, Jeong SM, Kim YJ, Lee DH. Review on hydrolysis methods of the macroalgae for production of bioethanol. *J KSWM*. 2012. 29:323-333.
- Park SM, Lee HH, Chang HC, Kim IC. Extraction and physicochemical properties of the pectin in citron peel. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2001. 30:569-573.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-

- Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999. 26:1231-1237.
- Rees D, Wight A. Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α -1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. *J Chem Soc B: Physical Organic.* 1971. 1366-1372.
- Renn D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. *Trends Biotechnol.* 1997. 15:9-14.
- Shekharam KM, Venkataraman LV, Salimath PV. Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga *Spirulina platensis*. *Phytochem.* 1987. 26: 2267-2269.
- Tsuchiya Y, Hong KC. Agarose and agaropectin in *Gelidium* and *Gracilaria* agar. *Tohoku J Agric Res.* 1965. 16:141-146.
- Usov AI, Smirnova GP, Klochkova NG. Algae polysaccharides. 55. Polysaccharide composition of some brown Kamchatka algae. *Bioorg Khim.* 2001. 27:444-448.
- Yang HN, Lee EH, Kim HM. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sci.* 1997. 61:1237-1244.
- Yap BHJ, Crawford SA, Dagastine RR, Scales PJ, Martin GJO. Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016. 43:1671-1680.