

해조류의 항산화 활성 및 아세틸콜린에스테라제 저해 활성

전영은¹ · 윤성복¹ · 임순성^{1,2} · 정차권¹ · 강일준^{1,2*}

¹한림대학교 식품영양학과

²한림대학교 식의약품 효능평가 및 기능성 소재개발센터

Antioxidant Activities and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities from Seaweed Extracts

Young Eun Jeon¹, Xing Fu Yin¹, Soon Sung Lim^{1,2}, Cha-Kwon Chung¹, and Il-Jun Kang^{1,2*}

¹Dept. of Food Sciences and Nutrition and ²Center for Efficacy Assessment and Development of Functional Foods and Drugs, Hallym University, Gangwon-do 200-702, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the antioxidant and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activities of extracts from various seaweed. The extracts of *Sargassum thunbergii* (91.3%), *Polysiphonia morrowii* (90.7%), *Ecklonia cava* (89.9%), and *Artemisia fukudo* (85.9%) showed over 80% high radical scavenging activities at the final concentration of 40 µg/mL. The *Artemisia fukudo* extract showed the highest inhibition activity of 30.2% on AChE at the final concentration of 10 µg/mL. The extract of *Porphyra tenera*, *Costaria costata*, *Monostroma nitidum*, *Ecklonia cava*, and *Agarum clathratum* against AChE at a concentration of 10 µg/mL exhibited inhibition of 26.6%, 25.3%, 23.4%, 21.7%, 20.4% and 19.9%, respectively. The bioautography results showed that the mixtures of structurally diverse compounds were thought to affect AChE inhibitory activity. These results suggest that extracts from seaweed with their high quality components may be effective in the prevention of Alzheimer's disease and may be used to develop various functional food products.

Key words: seaweed, Alzheimer's disease, DPPH radical scavenging, acetylcholinesterase, TLC bioassay

서 론

최근 평균수명의 증가로 인한 고령화 현상이 문제됨에 따라 노인 인구의 증가와 함께 노인성 질환 연구의 중요성이 강조되고 있다. 또한, 인구구조의 노령화는 치매와 같은 퇴행성 질환에 많은 관심을 기울이게 하고 있다. 이러한 퇴행성 질환은 활성산소에 기인된 것으로 알려져 있으며, 산화적 스트레스와 관련되어 사회적 문제가 되고 있다. Superoxide anion radical(O_2^-), hydroxyl($\cdot OH$), singlet oxygen(1O_2) 및 hydrogen peroxide(H_2O_2) 등 활성산소종이 신체 내에서 소거되지 않았을 때 free radical에 의해 노화 등 여러 질병의 원인으로 밝혀지면서 free radical에 작용하는 항산화제의 역할에 대한 연구가 끊임없이 진행되고 있다(1). 현재 사용되고 있는 합성항산화제의 심각한 독성과 부작용으로 인해 자연으로부터 안전하고 독성이 없는 천연항산화제를 찾기 위해 노력하고 있다.

치매는 기억력 장애, 판단력 상실 등 정신기능의 전반적인 장애를 가져오며, 결국 인간의 삶을 황폐하게 하는 질환이다. 치매의 원인질환으로는 약 70~80여 가지가 알려져 있

며, 그중에서 알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)은 가장 흔히 발생하는 치매로 치매 인구의 약 50%를 차지한다(2). AD 환자의 뇌조직을 관찰해보면 신경전달물질인 acetylcholine(ACh)이 정상인에 비해 부족해 인지기능이 저하되는 것으로 알려져 있다. 이를 바탕으로 acetylcholinesterase(AChE) 활성을 저해시켜 ACh의 양을 증가시키려는 시도가 많이 이루어지고 있으며(3,4), AChE 억제제와 항산화제 등이 처방되고 있다. 현재 AD의 치료제로 사용되는 약물은 AChE 저해제로 tacrine(5), donepezil(6), rivastigmine(7) 및 galantamine(8) 등이 있으며, 이러한 AChE 저해제들은 ACh의 분해를 막아 시냅스에서의 ACh 농도를 유지시킴으로써 저하된 인지기능을 개선시키는 효과를 나타낸다. 그러나 독성과 부작용으로 논란의 여지가 많아 새로운 치매 치료제를 위한 개발이 시급히 요구되고 있다(9).

해조류는 예로부터 아시아 지역에서 섭취해 왔으며, 영양학적으로 열량이 낮고 식이섬유, 비타민, 무기질 함량이 풍부하다. 특히 채소와 비교해 볼 때, 불포화지방산과 필수아미노산의 함량이 더 높은 것으로 알려져 있다(10). 해양에서 서식하는 해양생물은 육상생물과 구별되는 여러 가지 화합

*Corresponding author. E-mail: ijkang@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-248-2135, Fax: 82-33-255-4787

물을 함유하는 것으로 밝혀져 왔으며, 최근 해면, 갯지렁이 및 해조류의 추출물이 생리활성을 나타냄으로써 해양생물은 신약개발의 원료로서 주목받고 있다(11). 현재까지 해양 생물 추출물에서 생리활성을 보이는 대표적인 화합물군으로는 탄닌류(tannins), 테르펜류(terpene), 페놀류(phenols), 할로겐화합물군(halogenates) 및 카테킨류(catechins) 등이 알려져 있다(12). 이와 같이 해조류로부터 다양한 생리활성 물질들이 알려지면서 새로운 개발 자원으로서 생체량이 풍부한 해조류들의 잠재성이 재인식 되고 있다(13,14).

본 연구에서는 치매의 예방 및 치료물질 개발을 위한 기초 자료로 활용하기 위하여 여러 가지 해조류 추출물의 항산화 활성 및 AChE 저해활성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

해조류는 강릉대학교 해양생명공학부에서 분양받아 실험에 사용하였다. 국립수산물학원에서 집필한 한국 동해연안 해조류 생태도감을 이용하여 해조류를 동정하였고, 직접 동해안에서 해조류를 채집하였다. 본 연구에서 사용한 acetylthiocholine, acetylcholinesterase, dithiobisnitrobenzoic acid, Fast Blue B Salt, 1-naphthyl acetate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis,

MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 외 분석에 사용된 모든 시약은 특급을 사용하였다.

해조류 추출물 제조

녹조류 7종, 갈조류 12종, 홍조류 9종, 해상종자식물 1종 등 총 29종에 대하여 에탄올 추출물을 제조하였다(Table 1). 50 g의 해조류에 에탄올을 300 mL 첨가 후, 60°C에서 2시간씩 3회 반복 추출하였다. 추출된 에탄올 추출물은 원심분리기(Centrifuge UNION 55 R, Hanil, Gangneung, Korea)에서 10,000×g로 10분간 원심분리 하여 상등액을 evaporation flask에 옮겨 담고 evaporator(Büchi Rotavapor R-220, Flawil, Swiss)에서 40°C로 감압농축 하였다. Flask에 남은 추출물을 에탄올을 이용하여 녹여낸 후, vacuum oven에서 30°C로 48시간 동안 건조하였다.

해조류의 DPPH radical 소거능 측정

각 추출물을 DMSO에 녹인 후, 다양한 농도로 희석하여 추출물 1 mL, 에탄올 용액 2 mL, 0.15 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)용액 2 mL을 넣고 잘 혼합하였다. 이 반응 혼합액을 실온에 30분간 방치한 후에 570 nm에서 spectrophotometer(GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, WI, USA)로 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼의 제거활성을 나타냈으며, positive control로는 ascorbic acid를 사용하

Table 1. The yield of ethanol extracts from various seaweed

No.	Korean name	Scientific name	Yield (%) ¹⁾
E1	미역귀	Sporophyll of <i>Undaria pinnatifida</i>	6.2
E2	다시마	<i>Laminaria japonica</i>	2.8
E3	미역	<i>Undaria pinnatifida</i>	9.2
E4	모자반	<i>Sargassum fulvellum</i>	8.8
E5	도박	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	2.2
E6	감태	<i>Ecklonia cava</i>	21.6
E7	납작파래	<i>Enteromorpha compressa</i>	30.6
E8	돛	<i>Hizikia fusiforme</i>	6.6
E9	지누아리	<i>Grateloupia filicina</i>	9.2
E10	고리매	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	16.4
E11	김	<i>Porphyra tenera</i>	22.4
E12	매생이	<i>Capsosiphon fulvescens</i>	30.8
E13	구멍쇠미역	<i>Agarum clathratum</i>	10.0
E14	가시파래	<i>Enteromorpha prolifera</i>	10.4
E15	구멍갈파래	<i>Ulva pertusa</i>	16.0
E16	우뚝가사리	<i>Gelidium amansii</i>	15.2
E17	개도박	<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	7.2
E18	큰비쭈	<i>Artemisia fukudo</i>	29.2
E19	모로우붉은실	<i>Polysiphonia morrowii</i>	19.2
E20	참홀파래	<i>Monostroma nitidum</i>	29.6
E21	지층이	<i>Sargassum thunbergii</i>	14.8
E22	쇠미역	<i>Costaria costata</i>	17.2
E23	염주말	<i>Chaetomorpha moniligera</i>	9.4
E24	창자파래	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	8.6
E25	붉은까막살	<i>Prionitis cornea</i>	2.8
E26	불레기말	<i>Colpomenia sinuosa</i>	5.6
E27	진두발	<i>Chondrus ocellatus</i>	1.6
E28	주름진두발	<i>Chondrus crispus</i>	1.6
E29	참그물바탕말	<i>Dictyota dichotoma</i>	34.8

¹⁾Weight % of ethanol extract powder from 100 g of seaweed.

였다(15).

해조류의 AChE 활성 저해효과

Microplate assay: AChE 활성측정법은 acetylthiocholine을 기질로 사용하는 Ellman 방법(16)을 변형하여 분석하였다. 96 well microplate에 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 50 μ L, sample 10 μ L, enzyme(acetylcholinesterase) 10 μ L를 첨가하고, substrate solution 70 μ L(500 μ M acetylthiocholine iodide, 1 mM dithiobisnitrobenzoic acid(DTNB))를 첨가한 후, 405 nm에서 ELISA reader(ELx800T, BIO-TEK, Winooski, VT, USA)로 흡광도를 측정하였다.

Thin layer chromatography(TLC) bioassay: Acetylcholinesterase(EC 3.1.1.7, Sigma product No. C3389) 1000 Unit을 50 mM tris-hydrochloric acid buffer(pH 7.8) 150 mL에 녹여 사용하였다. 효소의 안정화를 위해 bovine serum albumin(150 mg)을 첨가하였고 4°C를 유지하도록 하였다. TLC plate는 acetone이나 isopropanol과 같은 적당한 용매에 전개시켜 세척한 후 충분히 말려 사용하였다. TLC plate에 sample를 점적 후 적당한 용매계로 전개한 후, 헤어드라이기로 용매를 충분히 날려주었다. 효소액을 뿌린 후, 차가운 바람으로 완전히 말려주었으며 1-naphthyl acetate(1.5

mg/mL) 뿌리고 plate와 물이 직접적으로 닿지 않게 습한 환경이 되도록 만든 plastic tank에 plate를 넣어 37°C에서 20분간 incubation을 하였다. Fast Blue B Salt(50 mg/100 mL)를 뿌려준 후 1~2분 후에 보라색을 확인하였다(17).

결과 및 고찰

해조류의 DPPH radical 소거능 측정

활성산소의 생성은 영양분 파괴로 인한 생체 내 불균형을 초래하며, 이에 산화적 스트레스가 증가하고 free radical 생성이 촉진되어 생체막 지질을 파괴한다. 산화적 스트레스는 세포내 단백질, 지질 및 DNA에 손상을 입히며 이러한 세포 혹은 세포내 물질의 산화적 손상은 알츠하이머, 파킨슨병과 같은 노화와 관련된 질환을 일으키게 되므로 활성산소를 제거하는 일이 알츠하이머병을 예방하고 치료하는데 매우 중요하다(18). 본 실험에서는 free radical로서 비교적 안정한 DPPH를 이용하여 해조류 추출물의 라디칼 소거활성을 측정하였다. 해조류 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 40 μ g/mL 농도에서 지충이가 91.3%, 모로우붉은실 90.7%, 감태 90%로 90% 이상의 라디

Table 2. Effects of various seaweed extracts on inhibition of DPPH radical scavenger activity

No.	Korean name	Seaweed species Scientific name	Inhibition (%) ¹⁾
E1	미역귀	Sporophyll of <i>Undaria pinnatifida</i>	20.3±0.7
E2	다시마	<i>Laminaria japonica</i>	46.3±0.7
E3	미역	<i>Undaria pinnatifida</i>	38.8±0.7
E4	모자반	<i>Sargassum fulvellum</i>	57.1±0.5
E5	도박	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	21.9±0.3
E6	감태	<i>Ecklonia cava</i>	89.9±1.0
E7	납작파래	<i>Enteromorpha compressa</i>	65.2±4.7
E8	톳	<i>Hizikia fusiforme</i>	13.3±5.8
E9	지누아리	<i>Grateloupia filicina</i>	—
E10	고리매	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	28.9±1.6
E11	김	<i>Porphyra tenera</i>	47.4±2.6
E12	매생이	<i>Capsosiphon fulvescens</i>	17.8±1.2
E13	구멍쇠미역	<i>Agarum clathratum</i>	61.5±1.3
E14	가시파래	<i>Enteromorpha prolifera</i>	—
E15	구멍갈파래	<i>Ulva pertusa</i>	—
E16	우뭇가사리	<i>Gelidium amansii</i>	—
E17	개도박	<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	1.1±1.5
E18	큰비쭈	<i>Artemisia fukudo</i>	85.9±1.4
E19	모로우붉은실	<i>Polysiphonia morrowii</i>	90.7±3.6
E20	참홀파래	<i>Monostroma nitidum</i>	54.1±6.7
E21	지충이	<i>Sargassum thunbergii</i>	91.3±0.6
E22	쇠미역	<i>Costaria costata</i>	4.2±1.5
E23	염주말	<i>Chaetomorpha moniligera</i>	22.5±2.9
E24	창자파래	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	15.4±2.7
E25	붉은까막살	<i>Carpopeltis cornea</i>	19.4±2.9
E26	불레기말	<i>Colpomenia sinuosa</i>	47.9±5.9
E27	진두발	<i>Chondrus ocellatus</i>	20.8±2.9
E28	주름진두발	<i>Chondrus crispus</i>	25.8±4.1
E29	참고물바탕말	<i>Dictyota dichotoma</i>	28.2±2.2

¹⁾Inhibition (%): The percentage of radical scavenger activity for each sample was compared with the control activity. The percentage of the control activity was 100%. The control was untreated. The final concentration of each sample in the assay mixture was 40 μ g/mL. Values represent the mean±SD (n=3).

칼 소거활성을 나타내었고, 큰비쭉은 86%, 납작파래 65.2%, 구멍쇠미역 61.5%의 radical 소거활성을 나타내었다. 지충이는 갈조식물 모자반과에 속하며 우리나라 전 연안에 분포하고 있다. 지충이는 항산화활성(19), 항균활성(20), 항염증활성(21)이 보고되어 있으며, 특히 메탄올 추출물은 대조구인 BHT보다 항산화 활성이 더 높다고 보고되고 있다(19). 모로우붉은실 또한 90% 메탄올 용매에서 항균활성이 우수하며 항산화 활성을 비교하였을 때, 대조구와 비슷한 활성을 가진다고 보고된바 있다(22). 해조류는 현재 많은 연구가 진행되지는 않았으나, 항산화 활성 및 여러 가지 생리활성을 잠재적으로 가진다고 기대된다. 나아가 이러한 기능성이 밝혀지면 식품산업과 제약산업 등에서 응용되어 고부가가치를 창출할 것이라 사료된다.

해조류의 AChE 활성 저해 효과

Microplate assay: 인지기능저하는 콜린성 신경세포 퇴화에 의한 ACh의 부족이 중요한 원인 중 하나이다. ACh는 신경조직에 존재하며 시냅스 전막에서 후막으로 신경의 자극을 전달하는 화학물질로 신경말단에서 분비된 ACh는 자극의 전달이 끝나면 AChE에 의해 choline과 acetate로 분해

되고 choline acetyltransferase(ChAT)에 의해 다시 합성된다. 체내의 신경전달이 원활하게 이루어지려면 ChAT와 AChE의 활성이 매우 중요하다(23). AD환자의 경우 ChAT가 감소하는 경향을 나타내고 있으며 AChE에 의해 ACh의 양이 정상인에 비해 50% 감소되어 인지기능이 저하되는 것으로 알려져 있다(24). 따라서 AChE를 억제하여 ACh의 양을 증가시키는 방법으로 인지기능을 호전시켜 치매치료에 사용하고 있다(25). 본 연구에서는 총 29가지의 해조류를 에탄올로 추출한 후 AChE 저해활성에 대하여 알아보았다(Table 3). Ellman의 방법을 변형하여 사용한 이 실험은 효소의 기질인 ATCh(acetylthiocholine)이 가수분해 되면 thiocholine과 acetate로 생성되는데 이 화합물이 DTNB(5,5-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid))와 반응해서 새로운 dithio 화합물과 2-nitrobenzoic acid의 thio 음이온이 만들어져 UV로 측정하면 405 nm에서 노란색을 띠게 된다(26). 29종의 해조류 에탄올 추출물 중에서 최종농도 10 µg/mL에서 큰비쭉의 저해율이 30.2%로서 AChE 저해활성이 가장 높았으며, 그 다음으로는 김 26.6%, 쇠미역 25.3%, 참홀파래 23.4%, 감태 21.7%, 구멍쇠미역 20.4%, 지충이 19.9%로 총 7종의

Table 3. Effects of various seaweed extracts on inhibition of AChE activity

No.	Korean name	Seaweed species Scientific name	Inhibition (%) ¹⁾
G	갈란타민	Galantamine	85.7±1.3
E1	미역귀	Sporophyll of <i>Undaria pinnatifida</i>	9.1±1.9
E2	다시마	<i>Laminaria japonica</i>	17.4±1.1
E3	미역	<i>Undaria pinnatifida</i>	20.4±1.6
E4	모자반	<i>Sargassum fulvellum</i>	15±0.8
E5	도박	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	7.8±1.7
E6	감태	<i>Ecklonia cava</i>	21.7±2.9
E7	납작파래	<i>Enteromorpha compressa</i>	14±2.4
E8	톳	<i>Hizikia fusiforme</i>	15.3±2.2
E9	지누아리	<i>Grateloupia filicina</i>	5.5±0.6
E10	고리매	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	13±1.3
E11	김	<i>Porphyra tenera</i>	26.6±2.6
E12	매생이	<i>Capsosiphon fulvescens</i>	13.2±1.2
E13	구멍쇠미역	<i>Agarum clathratum</i>	20.4±0.9
E14	가시파래	<i>Enteromorpha prolifera</i>	7.5±0.5
E15	구멍갈파래	<i>Ulva pertusa</i>	19.3±2.8
E16	우뚝가사리	<i>Gelidium amansii</i>	4.2±0.7
E17	개도박	<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	17.4±1.5
E18	큰비쭉	<i>Artemisia fukudo</i>	30.2±0.5
E19	모로우붉은실	<i>Polysiphonia morrowii</i>	8.3±4
E20	참홀파래	<i>Monostroma nitidum</i>	23.4±2.6
E21	지충이	<i>Sargassum thunbergii</i>	19.9±1.1
E22	쇠미역	<i>Costaria costata</i>	25.3±6.8
E23	염주말	<i>Chaetomorpha moniligera</i>	6.08±3.2
E24	창자파래	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	3.8±2.8
E25	붉은까막살	<i>Carpopeltis cornea</i>	15.5±9.4
E26	불레기말	<i>Colpomenia sinuosa</i>	2.9±1.5
E27	진두발	<i>Chondrus ocellatus</i>	8±0.1
E28	주름진두발	<i>Chondrus crispus</i>	0.3±2.5
E29	참그물바탕말	<i>Dictyota dichotoma</i>	—

¹⁾Inhibition (%): The percentage of enzyme activity for each sample was compared with the control activity. The percentage of the control activity was 100%. The final concentration of each sample in the assay mixture was 0.01 mg/mL. Values represent the mean±SD (n=3).

해조류가 20% 이상의 AChE 저해활성을 나타내었다.

TLC bioassay: 해조류의 AChE 저해활성을 재확인하기 위하여 TLC 방법으로 AChE의 저해활성 효과를 확인하였다. 가장 활성이 큰 7종의 해조류 에탄올 추출물을 TLC plate에 점적하여 전개한 후, 효소액과 1-naphthyl acetate를 뿌린 뒤 incubation 하고 Fast Blue B Salt를 뿌려 보라색을 관찰하였다(Fig. 1). 보라색 바탕에 white band로 보이는 부분이 AChE 억제 효능을 나타내는 compound로 양성대조군인 galantamine의 뚜렷한 white band를 확인하였으며, 나머지 7종의 해조류도 비슷한 활성을 나타내었다. 이 실험은 naphthyl acetate가 AChE에 의해 α -naphthol로 전환이 되고, α -naphthol은 2개의 active site form을 가지고 있는 Fast Blue B Salt와 반응하여 azo dye가 생성되어 purple색이 나타나게 된다. AChE 저해활성 성분이 있을 때, α -naphthol의 생산을 멈추게 되고 azo dye의 생산이 억제되므로 활성성분은 white band를 띠게 된다(27). 현재 AChE 억제제로 잘 알려져 있는 galantamine은 *Galanthus nivalis*로부터 얻어

진 물질로 50% 이상이 alkaloids 계열 화합물로 이루어져 있다. TLC 법에서 AChE 저해활성은 alkaloids의 존재로 나타나게 되는데 대부분의 천연물 AChE 저해활성 성분 추적에서 효과를 나타내는 것은 거의 alkaloids를 함유하고 있기 때문이다(28). Alkaloids를 TLC로 확인하는 방법에는 Dragendorff reagent를 발색하였을 때 orange-brown color를 나타내어 확인하는 방법과 5% sulfuric acid reagent를 처리한 후 UV-365 nm에 볼 때 yellow-green zone과 blue zone으로 alkaloids를 확인하는 방법이 있다(29). 본 연구에서 TLC plate에 5% sulfuric acid reagent를 처리 후 365 nm에서 살펴본 결과, galantamine과 큰비쭉에서 비슷한 blue zone을 확인하였으며, 이 물질로 인해 AChE 저해활성이 나타나는 것이라고 사료된다.

해조류 중에서 가장 강력한 활성을 나타낸 큰비쭉은 바닷가 염전 주변 습지에서 자라는 염생 식물로 전초에 alkaloids, 유기산, 탄닌, 옥시쿠마린과 10개 이상의 flavonoid를 함유하고 있다. 큰비쭉은 갯쭉 또는 바다가쭉이라고 하며 우리나라의 제주, 일본, 타이완의 해안가에 널리 분포하고 있으며(30), 항암, 항돌연변이 활성이 보고되어 있다(31,32). 최근 쭉쭉 연구에 대하여 Yoon 등(33)은 갯쭉 essential oil의 GC-MS를 이용한 화학적 성분조사로 주요 구성성분은 α -thujone(48.28%), β -thujone(12.69%)이었으며, 이는 항염증 효과가 뛰어나다고 보고하였다. 또한, 갯쭉의 메탄올 추출물, hexane과 chloroform 분획물에서 NO 생성 저해효과를 나타내어 새로운 암 예방인자분리를 위한 기초자료로 제시하였다(33). Daíse 등(34)은 쭉쭉 essential oil의 항균효과와 항산화효과를 발표하였으며, 특히 갯쭉(=큰비쭉) essential oil에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. Miyazawa 등(35)은 essential oil을 함유하며 AChE 저해활성을 나타내는 천연물 3종에 대하여 oil 안에 여러 가지 monoterpenoids의 존재로 활성이 나타난다고 보고하였다. Essential oil은 물에는 추출되지 않으며 methanol 또는 ethanol과 같은 유기용매에 추출되는 것으로 이번 연구에서 나타난 활성성분은 alkaloids 물질이거나 essential oil일 가능성이 높다. 두 번째로 활성을 나타낸 김은 인체가 이용한 해조류 중 가장 오래된 것으로 알려져 있으며, 영양소가 풍부하고 ω -3지방산인 eicosapentaenoic acid(EPA)와 taurine이 풍부하다(36). Mahinda 등(37)의 연구에서는 김을 여러 가지 enzymatic extracts를 이용하여 antioxidants, antiacetylcholinesterase, antiinflammatory 활성을 살펴본 결과, 김의 enzymatic extracts로 인해 phenolic content와 antioxidant 활성이 매우 높아졌으며, 강력한 AChE 저해활성과 항염증을 나타내었다고 보고하였다. 강력한 AChE 저해활성은 alkaloids 물질이거나 flavonoids로 인해 나타난다고 알려져 있으며(38), 이는 본 연구에서 확인한 김의 AChE 저해활성과 일치함을 보여준다. 쇠미역에 대한 연구로는 Svetlana 등(39)이 갈조류인 팽생이모자반, 감태, 쇠미역 fucoidan의 구조와 항암활성에 대

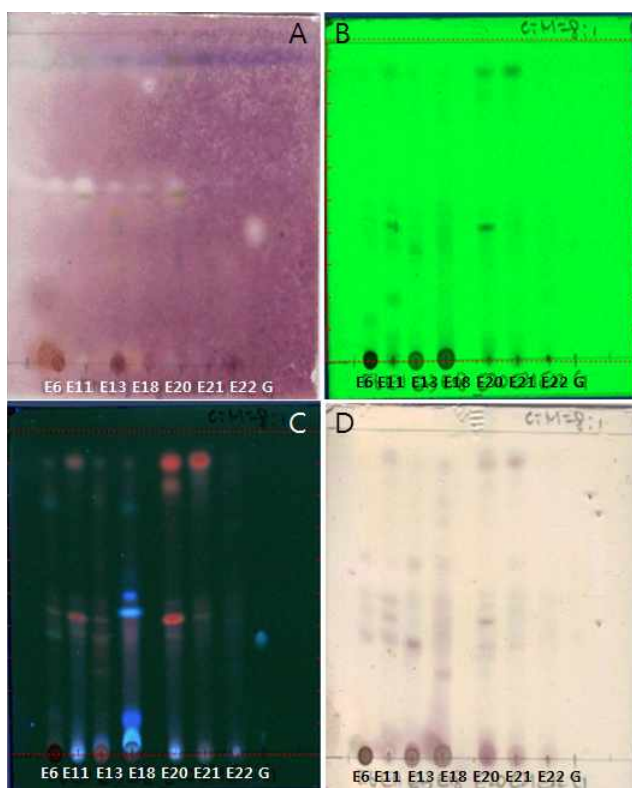


Fig. 1. Screening of ethanol extracts of seaweed for AChE inhibition using TLC assay method. A) White spots on the purple background represent the AChE inhibition when 1-naphthyl acetate (1.5 mg/mL) and Fast Blue B Salt (50 mg/100 mL) were sprayed, followed by 1000 Unit/mL of AChE spray. A total of 1 mL of 0.1 mM galantamine or 10 mg/mL samples were loaded on the TLC plate, and developed in chloroform : MeOH=8:1. E6, *Ecklonia cava*; E11, *Porphyra tenera*; E13, *Agarum clathratum*; E18, *Artemisia fukudo*; E20, *Monostroma nitidum*; E21, *Sargassum thunbergii*; E22, *Costaria costata*; G, galantamine. B) UV-254 nm (without chemical treatment), C) UV-365 nm (without chemical treatment), D) 10% sulfuric acid.

해 보고하였으며, AChE 저해활성은 본 연구가 처음으로 밝혀내었다. 참흠파래는 단백질, 섬유소, 지방, 칼슘 등 영양가가 높으며, 예로부터 식용으로 사용되어 왔다. 생리활성으로는 물 추출물의 항고지혈증 효과(40), 항암활성(41)이 밝혀져 있으며 아직까지 AChE 저해활성이 밝혀진 바 없다. Myung 등(42)이 발표한 논문에 따르면, 감태로부터 분리한 dieckol과 phlorofucofuroeckol이 기억력 향상을 나타내었고, AChE를 억제하여 뇌중의 ACh level을 높이는 것으로 보고되어 본 논문에서 나온 감태의 AChE 저해활성과 일치함을 보여준다. Wijesinghe 등(43)은 phlorotannin류인 dieckol과 phlorofucofuroeckol은 고혈압의 치료제로서의 가능성을 제시하였다. 이외에도 당뇨쥐에서의 α -glucosidase, α -amylase 저해활성(44), 항염증효과(45), 항고지혈증 효과 등(46)이 밝혀져 있다. 지충이는 우리나라 전 연안에서 흔히 볼 수 있는 해조류로서 어린 식물은 사료로 사용되고 있다. 향산화(19), 항염증(20), 항균(21) 등에 대한 생리활성이 보고되어있으며 AChE 저해활성에 대한 연구는 보고된 적이 없다.

지금까지 알려진 해조류의 종류는 남조류, 녹조류, 갈조류 및 홍조류를 모두 합쳐 262속 690종으로 밝혀졌다(1996년 환경부, 자연보호 중앙협의회). 예로부터 여러 가지 성인병 치료에 이용해 왔으나, 현재 우리가 식품 또는 사료로서 이용하고 있는 해조류는 10여종을 넘지 않고 있다. 일반성분 연구에 따르면 해조류는 alginic acid, mannitol, 회분, 요오드, 다당체, 폴리펩티드 등의 물질이 풍부하며, 다양한 미네랄을 함유한 알칼리성 식품이다. 소화흡수율이 낮아 영양학적으로 주목을 받지 못하였지만 최근 육상식물과 구별되는 독특한 구조로 여러 가지 생리활성을 나타내는 것으로 기대된다. 지금까지 해조류 유래의 AChE 저해제로는 김의 가수분해 추출물(37)과 감태로부터 분리된 phlorotannin류(42)로 광대한 자원에 비해 해조류의 연구는 미흡한 실정이다. 이에 비해, 해조류는 아직 개발되지 않은 수많은 종류가 있으며, 이들의 성분 연구와 생리활성 연구는 많은 가능성을 보여주고 있다. 따라서 본 연구에서는 앞으로 사용되어질 생체량이 풍부한 해조류를 이용하여 의약품 또는 건강기능성 식품으로서 산업적 이용가능성에 대하여 살펴보았다. AChE 저해활성을 나타내는 해조류 중에서 총 7종을 선별하였다. 이 7종은 퇴행성 질환의 하나인 치매 예방 가능성을 보여주었으나 이에 대한 생리활성 성분 추적과 보다 구체적인 AChE 저해 메커니즘 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 퇴행성 질환인 치매의 예방 및 치료를 위한 물질 탐색으로써 여러 가지 해조류 추출물을 가지고 항산화 활성 및 AChE 저해활성을 살펴보았다. DPPH법으로 항산화 활성을 살펴본 결과, 최종농도 40 μ g/mL에서 지충이(91.3%), 모로우붉은실(90.7%), 감태(89.9%), 큰비쭉(85.9%)

이 80% 이상의 radical 소거활성을 나타내었다. AChE 저해활성에서는 최종농도 10 μ g/mL에서 큰비쭉 추출물(30.2%)이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 다음으로는 김 추출물(26.6%), 쇠미역(25.3%), 참흠파래(23.4%), 감태(21.7%), 구멍쇠미역(20.4%), 지충이(19.9%) 순으로 총 7종의 해조류가 약 20% 이상의 AChE 저해활성을 나타내었다. 7종의 해조류를 가지고 TLC bioassay를 통하여 살펴본 결과, 여러 compound들에 의해 AChE 저해 활성이 나타나는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구 결과는 치매치료제 및 억제를 위한 신규의 생물 소재로 해조류가 가치가 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 한림대학교 교비연구비(HRF-201109-049)에 의하여 연구되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Reiter RJ. 1995. Oxidative process and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9: 526-533.
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Heber LE, Hennekens CH, Taylor JO. 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons, higher than previously reported. *JAMA* 262: 2551-2556.
- Davies P, Maloney AJ. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 25: 1403.
- Muir JL. 1997. Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 687-696.
- Kurz A. 1998. The therapeutical potential of tacrine. *J Neural Transm Suppl* 54: 295-299.
- Sugimoto H. 2001. Donepezil hydrochloride: a treatment drug for Alzheimer's disease. *The Chemical Record* 1: 63-73.
- Jann MW. 2000. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* 20: 1-12.
- Zarotsky V, Sramek JJ, Cutler NR. 2003. Galantamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *Am J Health-Syst Pharm* 60: 446-452.
- Nordberg A, Svensson AL. 1998. Cholinesterase Inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf* 19: 465-480.
- Jimenez-Escling A, Goni Cambrodon I. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch Latinoam Nutr* 49: 114-120.
- Chung HY, Ma WCJ, Ang PO, Kim JS, Chen F. 2003. Seasonal variations of bromophenols in brown plants (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. *J Agric Food Chem* 51: 2619-2624.
- Koing GM, Kehraus S, Seibert SF, Abdel-Lateff A, Muller D. 2005. Natural products from marine organism and their associated microbes. *Chem Biochem* 7: 229-238.
- Yoon SJ, Cho YS, Nam JH, Lee HH, Kim E, Hong YK. 2008. Effects of several seaweed extracts on the viability of human keratinocyte HaCaT cells. *J Kor Fish Soc* 41: 68-72.

14. Ryo T, Hiroko IS, Kaeko H, Saburo H, Susumu H. 1998. Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* post et ruprecht. *Carbohydr Polym* 35: 81-87.
15. Sa JH, Shin IC, Jeong KJ, Shim TH, Oh HS, Park SL, Cheung EH, Kim SN, Kim GK, Choi DS, Kwon YS, Kim CM. 2002. Catechin content and antioxidant effect from *Rosa davurica* Pall. *Kor J Pharmacogn* 33: 177-181.
16. Ellman GL, Callaway E. 1961. Erythrocyte cholinesterase levels in mental patients. *Nature* 192: 1216.
17. Yang Z, Zhang X, Duan D, Song Z. 2009. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *J Sep Sci* 32: 3257-3259.
18. Jeong EJ, Sung SH, Kim JW, Kim SH, Kim YC. 2008. *Rhus verniciflua* stokes attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Nat Prod Sci* 14: 156-160.
19. Choi SY, Kim SY, Hur JM, Choi HG, Sung NJ. 2006. Antioxidant activity of solvent extracts from *Sargassum thunbergii*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 139-144.
20. Kang JY, Khan MNA, Park NH, Cho JY, Lee MC, Fujii H, Hong YK. 2008. Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. *J Ethnopharmacol* 116: 187-190.
21. Lee SY, Song EJ, Kim KBWR, Yoon SY, Kim SJ, Lee SJ, Hong YK, Lim SM, Ahn DH. 2009. Antimicrobial activity of ethanol extract from *Sargassum thunbergii*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 502-508.
22. Je JY, Ahn CB, Oh MJ, Kang SY. 2009. Antioxidant activity of a red seaweed *Polysiphonia morrowii* extract. *Food Sci Biotechnol* 18: 124-129.
23. Vincenzo NT. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech of Ageing Dev* 122: 1961-1969.
24. Younkin SG, Goodridge B, Katz J, Lockett J, Nafziger D, Usiak MF, Younkin LH. 1986. Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimer's disease. *Fed Proc* 45: 2982-2988.
25. Houghton PJ, Yuhao R, Melanie-Jayne H. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* 23: 181-199.
26. Rhee IK, Richard M, Rijn van RM, Robert V. 2003. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem Anal* 14: 127-131.
27. Marstone A, Kissling J, Hostettmann K. 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitor in plants. *Phytochem Anal* 13: 51-54.
28. Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. 2008. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem Anal* 19: 411-419.
29. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. p 51-90.
30. Lee JK, Oh SH. 2008. Inhibitory effects of *Artemisia fukudo* Makino extracts for nitric oxide generation in LPS- and interferon- γ -stimulated RAW 264.7 cells. *J East Asian Soc Dietary Life* 18: 198-206.
31. Kim JO, Kim YS, Lee JH, Kim MN, Rhee SH, Moon SH, Park KY. 1992. Antimutagenic effect of the major volatile compounds identified from mugwort (*Artemisia asiatica* Nakai) leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 308-313.
32. Lee H, Lin JY. 1988. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. *Mutat Res Genet Toxicol* 204: 229-234.
33. Yoon WJ, Moon JY, Song G, Lee YK, Han MS, Lee JS, Ihm BS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG. 2010. *Artemisia fukudo* essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- κ B and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 48: 1222-1229.
34. Daíse LL, Alviano DS, Kolodziejczyk PP. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69: 1732-1738.
35. Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H. 1997. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *J Agric Food Chem* 45: 677-679.
36. Park CK, Kang TJ. 2000. The nutritional on functional constituents of laver. *Bull Fish Sic Inst Yosu Nat'l Univ* 9: 133-137.
37. Mahinda S, Ahn CB, Je JY. 2010. Enzymatic extracts from edible red algae, *Porphyra tenera*, and their antioxidant, anti-acetylcholinesterase, and anti-inflammatory activities. *Food Sci Biotechnol* 19: 1551-1557.
38. Jung MK, Park MS. 2007. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* 12: 2130-2139.
39. Svetlana E, Roza S, Kim SM, Um BH, Vladimir I, Tatyana Z. 2011. Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Ecklonia cava*, *Costaria costata*: structural characteristics and anticancer activity. *Appl Biochem Biotechnol* 164: 841-850.
40. Park IS, Choi NH, Kim JT, Ahn SH. 1998. The lipid accumulation suppressive effect of *Monostroma nitidum* in kidney of murine with hyperlipidemia induced by Triton WR-1339. *Dongguk J The Institute of Oriental Medicine* 6: 87-98.
41. Lee JM, You SG, Kim SM. 2005. Functional activities of low molecular weight peptides purified from enzymatic hydrolysates of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1124-1129.
42. Myung CS, Shin HC, Bao HY, Yeo SJ, Lee BH, Kang JS. 2005. Improvement of memory by dieckol and phlorofuroeckol in ethanol-treated mice: possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase. *Arch Pharmacol Res* 28: 691-698.
43. Wijesinghe WAJP, Ko SC, Jeon YJ. 2011. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Nutr Res Pract* 5: 93-100.
44. Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, Ko SC, Han JS, Jeon YJ. 2010. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase *in vitro* and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chem Toxicol* 48: 2633-2637.
45. Kim AR, Shin TS, Lee MS, Park JY, Park KE, Yoon NY, Kim JS, Choi JS, Jang BC, Byun DS, Park NK, Kim HR. 2009. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Agric Food Chem* 57: 3483-3489.
46. Yoon NY, Kim HR, Chung HY, Choi JS. 2008. Anti-hyperlipidemic effect of an edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*, and its constituents on poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. *Arch Pharmacol Res* 31: 1564-1571.

(2012년 1월 13일 접수; 2012년 2월 15일 채택)