

## 갈파래 (*Ulva lactuca*) 추출물의 항균 및 항산화 효과

김인혜<sup>1</sup> · 이희현<sup>2</sup> · 장정수<sup>3</sup> · 이상현<sup>1,2</sup> · 하종명<sup>1,2</sup> · 하배진<sup>1,2</sup> · 이재화<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

<sup>2</sup>신라대학교 공과대학 생명공학과

<sup>3</sup>(주) 바이넥스

## Antioxidant and Antimicrobial Activities of Seaweed, *Ulva lactuca*

In Hae Kim<sup>1</sup>, Hee-Hyun Lee<sup>2</sup>, Jeong Su Jang<sup>3</sup>, Sang Hyun Lee<sup>1,2</sup>, Jong-Myung Ha<sup>1,2</sup>,  
Bae-Jin Ha<sup>1,2</sup>, and Jae-Hwa Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Collage of Medical Life Science

<sup>2</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Collage of Engineering, Silla University,

Kwaebop-dong 1-1, Sasang-gu, Busan 607-736, Korea

<sup>3</sup>Binex Co. Busan, Jangrim-doing, Saha-gu, Busan 480-2, Korea

(Received May 10, 2006 / Accepted June 12, 2006)

**ABSTRACT :** Our investigation of the seaweed extracts, *Ulva lactuca*. The biological activities antioxidant, anti-microbial activity, antifungal and haemolytic activity of ethyl-ether and ethyl-acetate extracts from the seaweed, *Ulva lactuca* were investigated. They were separately extracted using ethyl-ether and ethyl-acetate from dried samples at room temperature and freeze dried. Seaweed extracts were found to cause significant free radical scavenging effects on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Seaweed extracts had not significant haemolytic activity against human erythrocyte. This extracts exhibited *in vitro* broad-spectrum antimicrobial activity of gram-negative, gram-positive bacteria and without antifungal activity.

**Key words :** *Ulva lactuca*, ethyl-acetate, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), haemolytic activity

### 서 론

최근 식생활 수준이 향상되고 식품의 안정성에 대한 의식이 고조되고, 보존료 및 식품 첨가물들을 화학합성 물질에서 천연물로 대체하려는 경향을 높아지고 있다 (Kim *et al.*, 1994). 천연 보존료의 사용은 일반적으로 사람이 오랫동안 섭취해 왔던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 이용되는 경우를 말한다. 또한 천연물에 존재하는 항균성 물질을 식품 보존제에 이용하고자한 연구도 오래전부터 활발히 수행되어 왔다 (Beuchat and Golden, 1989).

바다에 생육하고 있는 해조류에는 지구상에 알려진 많은 원소들이 축적되어 있다고 알려져 있다. 특히, 해조류는 이들 원소를 표면 전체로부터 흡수하여 수배에서 수만 배에 이르기까지 농축함으로 미네랄의 보고라고 할 수 있다 (Yoo *et al.*, 2001). 해조류는 오래전부터 우리나라를 비롯한 극동 지역에서 널리 식용으로 사용되고 있고, 비타민, 무기질 등

의 미량 성분들이 균형 있게 분포되어 있어 대사 작용의 개선 (Oh *et al.*, 1996), 저칼로리 다당류는 식이성 섬유로서 정장 작용과 유독 물질의 제거 효과 (Ayako *et al.*, 1982), 저분자 생리활성물질은 혈압과 콜레스테롤의 정상화 (Ryu *et al.*, 1989) 및 암 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 해조류에 포함된 다당류는 항균 및 항암 효과가 큰 것으로 나타나 있다 (Noda *et al.*, 1989). 해조류 특유의 점질 다당류는 수용성 섬유질로서 알긴산, 미네랄, 특히 나트륨 이온을 섭취할 경우 해조류에 포함된 알긴산이 나트륨이온을 흡착시켜 배설시켜줌으로 혈압 상승을 억제한다. 해조류 성분의 항암성에 관한 연구로는 다시마 등 수종의 갈조류를 항암제 개발의 원료로 이용할 수 있다는 것이 보고되었고, 모자반에서 얻은 다당류 분획이 수명연장의 효과 (Ito *et al.*, 1976), 녹조류, 갈조류, 홍조류에서의 항암 효과 (Ryu *et al.*, 1986), 해조류 추출물의 항돌연변이 효과 (Kim *et al.*, 1986) 등이 보고되어 있다. 또한, 해조류의 탄수화물은 비소화성 복합 다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 세균 효소에 의하지 않고서는 분해되기 어려워 이용에

\*To whom correspondence should be addressed

제한적이다 (Jung *et al.*, 1999).

녹조류 중 갈파래는 유럽에서도 오래전부터 식용으로 이용되어 다양한 식품학적 및 생리활성에 관한 연구가 보고되어 있다. 갈파래의 주요 특성의 하나는 육상 식물과 달리 황산기를 함유한 다당을 다량 함유하고 있으며 이 산성 다당은 항종양성, 항바이러스성, 면역증강 효과, 혈액의 항응고 작용 등이 보고되었으며, 국내에서도 홑파래에서 추출한 당단백질이 항암효과 및 면역활성이 보고된바 있다 (Ryu *et al.*, 1996).

본 연구에서는 갈파래 (*Ulva lactuca*)의 두가지 종류의 유기용매 추출물을 사용하여 gram-positive bacteria와 gram-negative bacteria의 다양한 균주를 대상으로 항균 활성을 측정하였고, 더불어 항산화 효과, 용혈작용 등의 생화학적 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용된 갈파래 (*Ulva lactuca*)는 2005년 12월에 부산 소재의 민락동 수변공원에서 수집하여 실험에 사용하였다. 시료는 ethyl-ether (Merk, Darmstadt, Germany)와 ethyl-acetate (Merk, Darmstadt, Germany)에 추출하여 동결 건조하여 사용하였으며 실험에 사용하기 전까지는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 시약 및 재료

Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  cartridge는 Waters사 (Miliford, MA, USA)에서 구입하였다. Tryptic soy broth (TSB)와 Lactose-Bouillon (LB), potato dextrose agar (PDA) 및 muller-hinton broth (MHB)는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 실험에 사용하였다. HPLC-grade의 water ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 및 acetonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )은 TEDIA사 (Ohio, USA)와 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 각각 구입하였고, trifluoroacetic acid (TFA), melittin, low EEO agar, streptomycin,  $\alpha$ -tocopherol 및 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

### 항균활성 측정

각 추출 분획에 대한 항균활성의 측정은 Radial diffusion assay법을 이용하여 *E. coli* D31와 *B. subtilis* PM125에 대한 성장 억제를 관찰하였고 활성 측정법은 다음과 같다 (Lehrer *et al.*, 1991). *E. coli* D31를  $37^{\circ}\text{C}$ 로 TSB에서 mid-logarithmic phase까지 배양한다. 그 후, 1.0 M phosphate buffer solution (pH 6.7)으로 3번 세정한 균배양액 1.0 mL

( $\text{OD}_{570}=0.1$ ,  $5 \times 10^7$  CFU/mL)을 LB와 혼합한다. 사용한 LB 배지는 5×LB broth; 20.7 mL, 1.0 M PBS (pH 6.7); 20.7 mL, D. W.; 58.6 mL, NaCl; 0.5 g, low EEO agar; 1.57 g, streptomycin이며 10 mg/mL 시료는 0.1% 초산 용액에 녹여 사용하였다. 준비된 LB 배지에 2-3 mm 정도의 well을 만든 후, well에 시료를 주입한 후,  $37^{\circ}\text{C}$  18시간 배양한 후, clear zone의 크기로 활성을 측정한다.

갈파래 추출물의 최소저해농도를 조사하기 위해 gram-positive bacteria로서 *Bacillus subtilis* PM125, *Micrococcus luteus* KCTC 1056 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 등을 사용하였고, gram-negative bacteria로는 *Escherichia coli* KCTC 1184, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004 및 *Salmonella typhimurium* KCTC 1925를 사용하였으며, 어병 세균으로는 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471과 *Edward tarda* NUF251을 사용하였다.

### 항곰팡이 활성 측정

항곰팡이의 활성 측정은 liquid growth assay method로 측정하였다 (Gibson *et al.*, 1991). *Candida albicans* KCTC 1940는 potato dextrose broth (PDB) 배지를 사용하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 배양하였다. 곰팡이의 농도는  $1 \times 10^6$  CFU/mL이 되도록 희석하여 96-well plate에 곰팡이 배양액과 연속적으로 희석한 펩타이드 용액을 혼합하였다. 이들은  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간동안 배양한 후 Microplate multi-detection (Synergy HT, Biotek, USA)을 이용하여 630 nm에서 측정하였다. 표준시료로서 벌독 유래의 항균활성 펩타이드인 melittin을 사용하였다.

### 용혈활성 측정

용혈 활성을 측정하기 위해서 신선한 적혈구를 150 mM NaCl을 포함한 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 세정하여 최종 적혈구의 농도를 5% (v/v)가 되도록 조정하였다 (Park *et al.*, 1996). 적혈구 용액과 연속적으로 희석한 시료액을 넣어  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 배양 후, 원심분리 (8,000×g, 10 min)를 행하였다. 그 상층액을 Microplate multi-detection (Synergy HT, Biotek, USA)을 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 적혈구에 시료액이 포함되지 않는 것을 0% (A)로 하고, 1.0% Triton X-100을 넣었을 때의 흡광도를 100% (B)로 정의하여, 시료액을 첨가했을 때 나타나는 상대적인 흡광도 (C)로부터 용혈활성 %를 계산하였다. 표준 시료로는 강력한 Mastoparan (Park *et al.*, 1996)이라는 물질을 사용하였다.

$$\text{Haemolysis (\%)} = (C - A / B - A) \times 100$$

### 항산화 측정

Free radical scavenging activity를 측정하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 방법을 사용하였다 (Kitagaki *et al.*, 1999, Koleva *et al.*, 2002). DPPH method는 다음과 같다. DPPH 16 mg을 100 mL의 EtOH에 녹여서 준비하고 시료 50  $\mu$ l에 DPPH stock 용액을 500  $\mu$ l 넣은 다음 total volume이 1.0 mL 되도록 EtOH를 첨가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후, spectrophotometer 517 nm에서 측정한다. 표준 시료로는  $\alpha$ -tocopherol (500  $\mu$ M)을 사용하였다. 시료의 흡광도를 ( $A_s$ )로 표준 시료의 흡광도를 ( $A_0$ )로 하여 항산화 효과를 측정하였다.

$$\text{Radical Scavenging Activity (RSA, \%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

### 결과 및 고찰

#### 항균활성 및 항곰팡이 활성

갈파래 (*Ulva lactuca*)의 두 종류인 ethyl-ether과 ethyl-acetate 추출물을 가지고 radial diffusion method로 항균활성을 측정하였고, clear zone의 크기로 활성의 강도를 비교하였다 (Fig. 1). 그 결과를 보면 ethyl-ether 추출물보다는 ethyl-acetate 추출물의 활성이 *E. coli* D31과 *B. subtilis* PM125 두 균주 모두 활성이 컸다. 또한 두 추출물은 gram-negative bacteria인 *E. coli* D31보다는 gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125에서 보다 큰 활성을 나타내었다.

갈파래 추출물의 항균 및 항곰팡이에 대한 활성을 각각의

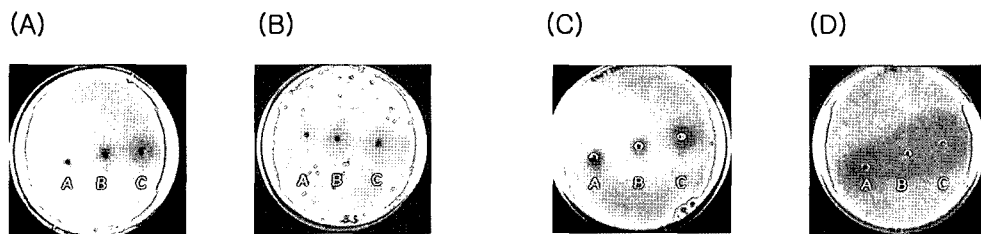


Fig. 1. Antimicrobial activities of the seaweed extracts, *Ulva lactuca*. Clear zone indicates antimicrobial activity of each extracts. (A) ethyl-ether extracts against *E. coli* D31, (B) ethyl-ether against *B. subtilis* PM125, (C) ethyl-acetate *E. coli* D31, (D) ethyl-acetate *B. subtilis* PM125, A; 5  $\mu$ l, B; 10  $\mu$ l, C; 15  $\mu$ l.

Table 1. Antimicrobial activity of seaweed extracts, *Ulva lactuca*

Microorganisms	Samples	Minimal inhibitory concentration ( $\mu$ g/mL)		
		ethyl-ether extracts	ethyl-acetate extracts	Melittin
<i>Gram-positive bacteria</i>				
<i>B. subtilis</i> PM125		200 $\mu$ g/mL	25 $\mu$ g/mL	0.78 $\mu$ g/mL
<i>M. luteus</i> KCTC 1056		NA*	100 $\mu$ g/mL	1.56 $\mu$ g/mL
<i>S. aureus</i> KCTC 1916		NA*	100 $\mu$ g/mL	3.13 $\mu$ g/mL
<i>Gram-negative bacteria</i>				
<i>E. coli</i> KCTC 1184		NA*	200 $\mu$ g/mL	0.78 $\mu$ g/mL
<i>K. pneumonia</i> KCTC 2208		NA*	100 $\mu$ g/mL	25 $\mu$ g/mL
<i>E. aerogenes</i> KCTC 2190		NA*	NA*	1.56 $\mu$ g/mL
<i>P. aeruginosa</i> KCTC 2204		NA*	NA*	25 $\mu$ g/mL
<i>S. typhimurium</i> KCTC 1925		NA*	200 $\mu$ g/mL	25 $\mu$ g/mL
<i>V. parahemolyticus</i> KCTC 2471		12.5 $\mu$ g/mL	6.25 $\mu$ g/mL	1.56 $\mu$ g/mL
<i>E. tarda</i> NUF251		50 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL	0.78 $\mu$ g/mL
<i>Fungi</i>				
<i>C. albicans</i> KCTC 7965		NA*	NA*	> 200 $\mu$ g/mL

\*: NA means not activity.

농도별로 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다 (Table 1). 활성의 세기를 관찰하기 위해 positive control (표준물질)로는 벌독 유래의 강력한 항균활성 물질인 melittin을 사용하였다. 먼저 ethyl-ether 추출물을 살펴보면 gram-positive bacteria인 *B. subtilis* PM125에 대해서만 200 µg/mL의 농도에서 활성을 나타내었고 *M. luteus*와 *S. aureus*에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. Gram-negative bacteria의 경우는 거의 활성을 나타내지 않았고 반면에 어병 세균인 *Vibrio sp.*에서 12.5 µg/mL의 농도에서 활성을 나타내었고 *Edward sp.*에서는 50 µg/mL의 농도에서 활성을 나타내었다. 다음은 ethyl-acetate 추출물의 경우, *B. subtilis* PM125에 대해서는 25 µg/mL의 낮은 농도에서 높은 활성을 보였으며, *M. luteus* KCTC 1056에는 100 µg/mL, *S. aureus* KCTC 1916에 대한 활성은 100 µg/mL의 농도에서 활성을 나타내었다. *E. coli* D31에 200 µg/mL, *K. pneumonia* KCTC 2208에 대해서는 100 µg/mL, *S. typhimurium* KCTC 1925에 대해서는 200 µg/mL의 농도에서 활성을 나타내었다. 그러나 해양 세균인 *V. parahaemolyticus* KCTC 2471에 대해서는 6.25 µg/mL의 아주 낮은 농도에서 높은 활성을 나타내었고, *E. tarda* NUF251에 대해서는 50 µg/mL의 비교적 높은 활성을 나타내었다. 반면에, 곰팡이인 *C. albicans* KCTC 7965에 대하여는 활성을 나타내지 않았다.

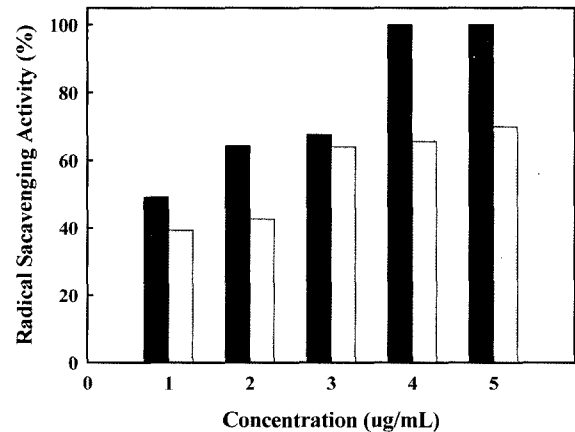
#### 용혈활성 및 항산화 측정

적혈구 막에 대한 갈파래 추출물의 용혈 활성을 조사하기 위하여 인간의 적혈구를 사용하여 조사하였다 (Table 2). 두 추출물 모두 200 µg/mL의 농도에서는 90% 이상의 강력한 용혈활성을 보였고, 100 µg/mL이 농도에서는 약 70%, 50 µg/mL의 농도에서 68%의 용혈활성을 나타내었다. 반면에 그 이하의 낮은 농도인 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.13 µg/mL, 1.56 µg/mL, 0.78 µg/mL 및 0.39 µg/mL에서는 2% 미만의 낮은 활성을 나타내었다.

갈파래 추출물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 방법을 이용하여 라디칼 소거능력을 조사하였다 (Fig. 2). Fig. 2를 살펴보면 ethyl-ether 추출물의 경우, 25, 12.5 µg/mL에서는 100%의 항산화 효과를 나타내었으며 6.25 µg/mL의 농도에서 67.6%, 3.13 µg/mL의 농도에서 64.3% 그리고 마지막으로 1.56 µg/mL의 농도에서 49.3%의 항산화 활성을 나타냈다. ethyl-acetate 추출물의 경우는 25 µg/mL의 농도에서 70%, 12.5 µg/mL의 농도에서는 65.6%, 6.25 µg/mL의 농도에서는 64%, 3.13 µg/mL의 농도에서 42.6%, 1.56 µg/mL의 농도에서 39.3%의 항산화 활성을 나타내었다.

**Table 2.** Determination of haemolytic activity using human RBC

Concentration	Haemolytic activity (%)		
	ethyl-ether extracts	ethyl-acetate extracts	Mastoparan
200 µg/mL	99	99.9	99.9
100 µg/mL	71	70	99.9
50 µg/mL	68	1.9	99
25 µg/mL	0.99	1.1	99
12.5 µg/mL	0.99	1.0	99
6.25 µg/mL	0.99	0.99	90
3.13 µg/mL	0.99	0	90
1.56 µg/mL	0	0	68
0.78 µg/mL	0	0	64
0.39 µg/mL	0	0	41



**Fig. 2.** Free radical scavenging effect on DPPH from the seaweed extracts. Symbols: Black; ethyl-ether extracts, Gray: ethyl-acetate extracts, Concentration: 1; 1.56 µg/mL, 2; 3.13 µg/mL, 3; 6.25 µg/mL, 4; 12.5 µg/mL, 5; 25 µg/mL.

#### 감사의 글

본 연구는 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성 사업의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사를 드립니다.

#### 참고 문헌

- Ayako, Y., Koichi, Y. and Keiichi, O. (1982) Iodine distribution in blades of several laminarias grown in the same sea area. *Bull Japan Soc. Sci. Fish.* **58**, 1373-1379.
- Beuchat, G.C. and Golden, D.A. (1989) Antimicrobial occurring naturally in foods. *Food Technol.*, **43**, 134-142.
- Bin, J.-H., Kim, H.-D. and Ryu, B.-H. (1996) Anticomplementary activities of rhamman sulfate extracted from *Monas-*

- tromsa nitidum*. *Korean J. Food & Nutr.*, **4**, 490-495.
- Gibson, B.W., Tang, D.Z., Mandrell, R., Kelly, M. and Spindel, R. R. (1991). Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of asian toad, *Bomina orientalis*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23103-23111.
- Ito, H. and Sugimura, M. (1976) Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thunbergii*. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1114-1115.
- Jung, J.Y., Hur, S.S. and Choi, Y.H. (1999) Studies on the efficient extraction process of alginic acid in sea tangle. *Food Eng. Proc.*, **3**, 90-97.
- Kim, S.B., Park, Y.H., Hayase, F. and Kata, H. (1986) Desmutagenic effects of mailard reaction products against mutagenic heterocyclic amines. *Bull Korean Fish Soc.*, **19**, 127-135.
- Kim, S.-H., Lim, S.-B., Ko, Y.-H., Oh, C.-K., Oh, M.-C. and Park C.-S. (1995) Extraction yield of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. *Bull Korea Fish Soc.*, **27**, 462-468.
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R. and Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*, **137**, 167-173.
- Noda, H., Amano, H., Arshima, S., Hashimoto, S. and Nisizama, K. (1989) Studies on the antitumor activity of marine algae. *Bull Japan Soc. Sci. Fish*, **55**, 1259-1264.
- Park, N.G., Yamato, Y., Lee, S.M., Sugihara, G., Park, J.-S. and Kang, S.-W. (1996). The interaction of mastoparan B from venom of hornet *Vespa basalis* with phospholipid matrices. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **17**, 50-56.
- Ryu, B.H., Choi, B.H., Kim, D.S. and Ha, M.S. (1986) Desmutagenic effects of extract obtained from seaweeds. *Bull Korean Fish Soc.*, **19**, 502-508.
- Ryu, B.H., Kim, D.S., Cho, K.J. and Sin, D.B. (1989) Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **21**, 595-600.
- Yoo, J.S., Cheun, B.S. and Kim N.-G. (2001) Determination of Na<sup>+</sup> channel blocker in seaweeds. *Korean J. Environ. Biol.*, **19**, 107-112.