

## 제주 용암해수를 이용한 감태(*Ecklonia cava*) 추출물의 항산화 및 항염증 효능

이연지 · 박아름이 · 강나래 · 강도형<sup>1</sup> · 허수진\*

한국해양과학기술원 제주특성연구센터, <sup>1</sup>한국해양과학기술원 원장실

### Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of *Ecklonia cava* Extract Using Jeju Lava Seawater

Yeon-Ji Lee, Areumi Park, Nalae Kang, Do-Hyung Kang<sup>1</sup>, and Soo-Jin Heo\*

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

<sup>1</sup>*Office of The President, Korea Institute of Ocean Science Technology (KIOST)*

#### Abstract

The study investigated the potential effect of the *Ecklonia cava* extract by using Jeju lava seawater (ECE-JLS; hardness: 100, 300 mg/L), which is naturally filtered underground by a volcanic rock layer. The chemical composition, antioxidant-related enzyme activities, radical scavenging activities, reactive oxygen species (ROS) production in Vero cells, and nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 cells were measured to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of the extract. The total polyphenol and flavonoid contents of ECE-JLS100 and 300 were 156.41±1.15, 166.16±2.27 mg/g, and 343.76±2.40, 373.90±3.67 mg/g, respectively. The concentration of ECE-JLS' SOD and CAT-like activities was increased. ECE-JLS in the range of 0.25 to 2 mg/mL exhibited remarkable DPPH radical and hydrogen peroxide scavenging activities. ECE-JLS100 and 300 inhibited total ROS generation by 21.4±0.4 and 23.9±0.3% in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Vero cells at 200 µg/mL concentration, respectively. ECE-JLS100 and 300 decreased NO production, with levels of about 55.0±2.4 and 56.5±1.8% at 200 µg/mL concentration, respectively. The contents of TNF-α were decreased compared to the negative control. These observations provide helpful information for the potential industrial use of Jeju lava seawater. Also, ECE-JLSW could be used as a functional food material.

**Keywords:** Jeju lava seawater, *Ecklonia cava*, antioxidant, anti-inflammatory

#### 서 론

염증반응은 병원체, 손상된 세포 또는 자극 물질로 인한 조직손상을 제어하고 치유하는 과정에 나타나는 정상적인 숙주 방어 반응이다(Kang et al., 2011). 염증 과정은 대식세포, 호중구, 호산구 및 단핵 식세포와 같은 염증 세포에 의해 매개된다. 대식세포는 박테리아 내독소, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)와 같은 자극으로 유도성 산화질소 합성효소(iNOS), 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 및 염증성 사이토카인(TNF-α, 인터루킨-1β, 인터루킨-6)이 활성화 되어 산화질소(nitric oxide, NO), 프로스타글란딘과 같은 염증 매개 물질을 분비한다(Asanka Sanjeeva et al., 2019). 그러나 NO는 과량으로 존재할 때 신경의 손상 및

부종을 일으키고 유전자 변이를 유도하는 등 과도한 염증 반응을 일으킨다(Gabay, 2006; van Triel et al., 2010). 대부분의 경우 염증은 조직에 침투한 대식세포에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 여러 경로를 통해 염증성 사이토카인의 발현을 조절함으로써 염증반응을 매개한다고 알려져 있다(Hensley et al., 2000). 산화 스트레스는 체내의 ROS 생성과 세포내 항산화 작용들에 의해 다양한 세포 및 조직에 심각한 손상을 일으켜, 노화, 암, 당뇨병 및 염증과 같은 여러 가지 질병들의 원인이 된다(Kim et al., 2021). 여러 가지 합성 항산화제와 항염제는 이러한 활성산소종 및 염증 매개 물질의 생성 억제에 많이 사용되고 있지만 부작용과 독성이 발견되기 때문에 합성 물질을 대체하기 위한 천연 항산화제 및 항염제 발굴은 필수적이다.

제주 용암해수는 바닷물이 화산암반층에 의해 지하로 자연 여과되어 생성되는 제주만의 독특한 지하수자원이다(Lee et al., 2016). 제주 용암해수는 항비만(Noh et al., 2010), 대사 활동 개선(Kim et al., 2012), 피부보습(Lee et al., 2016) 등의 여러 생리활성이 있는 것으로 알려져 있어

\*Corresponding author: Soo-Jin Heo, Jeju Marine Research Center, Korea Institute of Ocean Science Technology (KIOST), 2670, Iljuong-ro, Gujwa-eup, Jeju-si, Jeju-do 63349, Korea  
Tel: +82-64-798-6101; Fax: +82-64-798-6085  
E-mail: sjheo@kiost.ac.kr  
Received October 30, 2022; revised November 28, 2022; accepted November 28, 2022

식품 가공, 화장품 제조와 식물재배 등 다양하게 연구 및 활용되고 있다. 한국의 「먹는 물 수질기준(2018)」에 따르면 물의 경도는 1,000 mg/L (수돗물의 경우 300 mg/L, 먹는 염지하수 및 먹는 해양심층수의 경우 1,200 mg/L)를 넘지 않아야 한다고 규정되어 있다. 용암해수 원수 자체는 NaCl과 미네랄 함량이 매우 높기 때문에(Jung et al., 2009), 현재 국내에서는 경도 100-500 mg/L의 용암해수가 먹는 샘물로 시판되고 있다. 용암해수는 또 다른 해양 수자원인 심층해양수와 유사하게 다량의 미네랄 성분을 가지고 있으나 약 100-200 m의 지하에서 얻을 수 있으므로 350 m 이상 심해에서 채수하는 심해수에 비해 더 경제적인 이점을 가진다(Kang et al., 2021).

갈조류인 감태(*Ecklonia cava*)는 일본과 한국 남부 해안에 분포하며 우리나라 연안을 따라 조간대 수심 5-25 m에서 자라며, 항산화, 항염증(Kang et al., 2011), 항응고(Wijesinghe et al., 2011), 항바이러스(Ryu et al., 2011), 항당뇨(Lee et al., 2012b) 효과 등의 생리활성을 갖는 카로티노이드, 후코이단, 플로로탄닌과 같은 다양한 천연 물질을 함유하는 것으로 보고된 바 있다(Wijesinghe & Jeon, 2012). 이 때문에 감태는 최근 몇 년 동안 의약품 및 기능성 식품으로 개발되기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있으며(Ahn et al., 2007), 최근에는 일반 자연의 감태보다 제주 용암해수로 배양한 감태가 미백 효능이 뛰어나다는 연구가 보고되었다(Ding et al., 2019). 그러나 지금까지 용암해수를 용매로 이용한 감태추출물에 대한 항산화 및 항염증 활성에 대한 연구는 수행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 용암해수를 이용한 감태 추출물의 Vero 세포에의 항산화 효능과 Raw 264.7 세포에서 항염증 효과를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 추출 방법

본 실험에 사용된 감태(*E. cava*)는 제주도 제주시 소재의 (주)생생드림 업체에서 구입하였으며, 추출용매인 용암해수는 제주시 소재의 (재)제주테크노파크 용암해수센터에서 제공받아 사용하였다. 용암해수의 경도는 국내 시판 중인 먹는 샘물의 경도를 참고하여 100, 300 mg/L의 두 가지 경도를 선정하여 실험에 사용하였다.

감태를 100, 300 mg/L의 경도의 용암해수를 이용하여 2% (w/v) 용액을 만들어 실온에서 24시간 동안 교반 추출을 진행하였다. 추출액을 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 No.1 filter paper (Whatman Ltd., Maidstone, UK)를 통해 여과하여 고형물을 제거하고 수득물을 측정하여 비교하였다. 제조된 추출물을 경도별로 ECE-JLS100, ECE-JLS300 (*E. cava* extract using Jeju Lava Seawater)으로 명명하고 이를 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

추출물의 총 폴리페놀 함량은 Jung et al. (2009)의 방법을 이용하여 측정하였다. 농도가 0.1 mg/mL인 추출물에 95% 에탄올을 가하여 2배 희석시킨 후 추출물 시료 1 mL에 증류수 2.5 mL를 가하였다. 50% Folin-ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 250 µL를 첨가하여 5분 반응시키고 이후 5% sodium carbonate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액 500 µL를 첨가하였다. 암실에서 1시간 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드의 함량은 Davies et al. (2018)의 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 2 mg/mL 농도인 추출물 100 µL에 diethylene glycol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1 mL와 1 N NaOH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 µL를 혼합하여 37°C에서 반응시켰다. 1시간 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로 quercetin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

### Superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 유사 활성 측정

ECE-JLS의 SOD 유사활성을 측정하기 위해 EZ-SOD assay kit (DG-SOD400, DoGenBio, Korea)를 사용하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 20 µL의 샘플에 WST working solution 200 µL와 enzyme working solution 20 µL를 첨가하여 37°C에서 20분 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 샘플을 넣지 않은 blank 1, enzyme working solution을 넣지 않은 blank 2와 샘플 및 enzyme working solution을 넣지 않은 blank 3을 각각 계산하여 아래의 식을 통해 SOD 유사활성도를 계산하였다.

#### SOD activity (%)

$$= 1 - \frac{[(\text{blank 1 absorbance} - \text{blank 2 absorbance}) / (\text{blank 1 absorbance} - \text{blank 3 absorbance})] \times 100}$$

CAT 유사 활성은 EZ-Catalase assay kit (DG-CAT400, DoGenBio, Korea)를 사용하여 측정하였다. 25 µL의 샘플에 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 20 µL 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 50 µL의 oxi-Probe/HRP working solution을 첨가하였다. 이후 560 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 샘플을 넣지 않은 control 및 HRP가 제외된 oxi-Probe/HRP working solution을 첨가한 blank를 각각 계산하여 아래의 식을 통해 CAT 유사활성도를 계산하였다.

#### CAT activity (%)

$$= 1 - \frac{[(\text{sample absorbance} - \text{blank absorbance}) / (\text{control absorbance} - \text{control-blank absorbance})] \times 100}$$

결과를 바탕으로 MS Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 이용하여  $EC_{50}$ 을 산출하였다.

#### 라디칼 소거 활성 측정

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 환원에 의한 자유 라디칼 소거 활성 측정은 샘플 20  $\mu$ L를 0.15 mM DPPH solution 180  $\mu$ L와 혼합하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 515 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

Hydrogen peroxide 라디칼 소거능은 Park et al. (2000)의 방법에 따라 측정하였다. 샘플 20  $\mu$ L에 0.1 M의 sodium phosphate buffer 100  $\mu$ L와 10 mM의 hydrogen peroxide 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 이후 1.25 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 1 unit/mL의 peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 각각 30  $\mu$ L를 첨가하여 다시 37°C에서 10분간 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 양성 대조군(positive control)으로는 N-acetyl cysteine (NAC; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

#### Radical scavenging activity (%)

$$= 1 - \frac{(\text{sample absorbance} - \text{sample-blank absorbance})}{(\text{blank absorbance})} \times 100$$

#### 세포배양

원숭이 신장 세포인 Vero 세포와 마우스 대식세포인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 각각 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 함유하는 Rosewell park memorial institute 1640 (RPMI 1640; WELGEN, Korea) 배지와 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기 내에서 배양하였다.

#### Vero 세포에서의 세포독성 평가

ECE-JLS의 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) assay 방법을 사용하였다. Vero 세포를  $0.5 \times 10^5$  cells/mL 농도로 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 샘플을 농도 별로 처리하였다. 24시간 후 5 mg/mL의 MTT 용액을 처리하여 3시간 반응시켜 형성된 포르마잔(formazan) 결정을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)로 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 Vero 세포에서의 보호 효과

ECE-JLS의 처리에 따른 Vero 세포 생존율을 확인하기 위해 MTT assay를 사용하였다. Vero 세포를  $0.5 \times 10^5$  cells/mL 농도로 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 샘플을 농도 별로 처리하였다. 1시간 후 최종 처리 농도 0.15 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 24시간 후 5 mg/mL의 MTT 용액을 처리하여 3시간 반응시켰다. 형성된 포르마잔(formazan) 결정을 DMSO로 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 Vero 세포에서의 ROS 생성 측정

ECE-JLS의 ROS 생성 저해 활성을 확인하기 위해 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. DCF-DA가 ROS에 의해 DCF로 산화되어 초록색을 띠는 형광 물질로 전환되는데 이를 측정하여 ROS 생성을 확인하였다. Vero 세포를 96 well plate에  $0.5 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 샘플을 농도 별로 처리하였다. 1시간 후 세포에 최종 처리 농도 0.15 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 30분 반응시키고 DCF-DA를 처리하였다. 암실에서 5분간 반응 후 형광값(Ex/Em = 485/528 nm)을 측정하여 계산하였다.

#### Hoechst 33342 염색에 의한 세포사멸 분석

세포 투과성 DNA 염색 시료인 Hoechst 33342 (NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 핵 형태를 확인하였다. Vero 세포를  $3 \times 10^5$  cells/mL 농도로 4 well chamber slide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 24시간 배양한 후, 샘플을 농도 별로 처리하였다. 1시간 후 최종 처리 농도 0.15 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 6시간 동안 배양한 뒤 confocal microscope (SP8 Lightning, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 세포를 관찰하였다.

#### LPS로 유도된 Raw 264.7 세포에서의 보호 효과

Raw 264.7 세포 생존율은 EZ-Cytox (EZ-3000, DoGenBio Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기 내에서 24시간 배양한 후 추출물을 농도 별로 처리하였다. 1시간 후, 염증 유발물질인 LPS를 최종 농도 1  $\mu$ g/mL로 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 EZ-Cytox 용액을 처리하여 1시간 30분 뒤에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Raw 264.7 세포에서의 LPS로 유도된 NO 생성 저해 활성

Raw 264.7 세포를 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL로

분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기 내에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 각 추출물을 농도 별로 1시간 처리 후 최종 농도 1 µg/mL의 LPS를 처리하였다. 24시간 후 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(0.5% sulfanilamide, 0.05% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 염증 유발 사이토카인 TNF-α 생성 저해 활성

Raw 264.7 세포를 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포 배양기 내에서 24시간 배양한 후 농도 별로 추출물을 1시간 처리하였다. 최종 농도 1 µg/mL의 LPS를 처리하여 24시간 후, 세포 배양액으로부터 분비된 TNF-α의 생성 변화를 mouse TNF-α ELISA Set II kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 측정하였다. 세포 배양액을 10배 희석한 후 kit 제조사의 프로토콜에 따라 TNF-α의 단백질 양을 측정하였다.

#### 통계학적 분석

GraphPad Prism 소프트웨어 v.9.1.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 통계분석을 수행하였다. 모든 실험은 3반복(n=3)으로 수행되었으며, 데이터는 평균±표준 편차로 표시되었다. 통계적 차이(P<0.001, 0.01, 0.5)는 one-way ANOVA 평가하여 Dennett's test로 사후 검정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 추출 수율, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

폴리페놀 또는 페놀 화합물은 효과적인 항산화 효능 및 자유 라디칼 소거 능력이 있으며, 해조류는 이러한 폴리페놀이 풍부하다고 알려져 있다(Fernando et al., 2016). Wang et al. (2009)의 해조류 추출물의 항산화 연구에 의하면 홍조류 및 녹조류보다 갈조류가 더 많은 양의 폴리페놀을 함유하며 용매에 따라 총 폴리페놀 함량과 항산화 활

성에 영향을 준다고 보고되어 있다. 특히 감태는 항산화, 항암 및 항고혈압 등의 기능이 있는 폴리페놀인 플로로탄닌 등이 함유되어 있다고 알려져 있다(Kim et al., 2014). ECE-JLS100 및 ECE-JLS300의 추출 수율은 각각 31.82±1.73, 35.83±1.74%였으며, 총 폴리페놀 함량은 각각 156.41±1.15, 166.16±2.27 mg gallic acid equivalent (GAE)/g으로 나타났다. 또한, ECE-JLS100 및 ECE-JLS300의 플라보노이드 함량은 각각 343.76±2.40, 373.90±3.67 mg quercetin equivalent (QE)/g으로 나타났다(Table 1). Chan et al. (2015)은 홍조류 물 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량(각각 6.06 mg/g 및 22.14 mg/g)을 조사하였으며 Farasat et al. (2013)은 갈파래 메탄올 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량(각각 1.37-4.47 mg/g 및 7.96-45.58 mg/g)을 보고하였다. 이러한 결과와 비교하였을 때, ECE-JLS가 더 높은 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 갖는 것으로 나타났다. 또한, Lee et al. (2013b)의 연구에 따르면, 일반적인 추출 방법인 물을 용매로 한 감태 추출물의 수율은 28.67±1.4%와 총 폴리페놀 함량은 47.7 mg/g을 나타내, 물 추출물보다 용암해수를 이용한 감태 추출물의 수율과 폴리페놀 함량이 더 높은 것으로 나타났다.

#### SOD, CAT 유사 활성

SOD는 체내에 유해한 superoxide를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환시킨 후 catalase에 의해 최종적으로 물과 산소로 변환시켜 활성산소로부터 세포를 보호하는 항산화 효소이다(Choi et al., 2009). SOD 및 CAT 유사 활성은 superoxide를 정상의 산소로 전환시킬 수는 없으나 반응성을 억제하여 생체를 산화적 손상으로부터 보호할 수 있는 물질의 활성을 의미한다. ECE-JLS의 SOD 및 CAT의 유사 활성을 분석한 결과, ECE-JLS는 용암해수 정도에 상관없이 31.25-2,000 µg/mL의 범위에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 SOD 및 CAT 유사 활성 수준을 증가시키는 것으로 나타났다(data not shown). 특히, SOD 유사 활성의 EC<sub>50</sub>은 ECE-JLS100 및 ECE-JLS300이 각각 166.94±17.21 및 116.39±24.88 µg/mL로 나타났으며, CAT 유사 활성의 EC<sub>50</sub>은 ECE-JLS100

**Table 1. Extraction yield, chemical properties and antioxidant related enzyme activity of ECE-JLS**

Extracts	Yield (%)	Total polyphenol content (mg GAE/g) <sup>2)</sup>	Total flavonoids content (mg QE/g) <sup>3)</sup>	SOD <sup>4)</sup> -like activity (EC <sub>50</sub> <sup>6)</sup> µg/mL)	CAT <sup>5)</sup> -like activity (EC <sub>50</sub> µg/mL)
ECE-JLS100 <sup>1)</sup>	31.82±1.73	156.41±1.15	343.76±2.40	166.94±17.21	214.59±4.93
ECE-JLS300 <sup>1)</sup>	35.83±1.74	166.16±2.27	373.90±3.67	116.39±24.88	187.20±10.55

ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater.

<sup>1)</sup>All values are mean±S.D. (n = 3).

<sup>2)</sup>GAE, gallic acid equivalent.

<sup>3)</sup>QE, Quercetin equivalent.

<sup>4)</sup>SOD, Superoxide dismutase.

<sup>5)</sup>CAT, Catalase.

<sup>6)</sup>EC<sub>50</sub> value, effective concentration at which antioxidant related enzyme activity was 50% obtain from linear regression analysis.

및 ECE-JLS300이 각각 214.59±4.93 및 187.20±10.55 µg/mL로 나타나, ECE-JLS100보다 ECE-JLS300이 더 높은 활성을 보였다(Table 1). 이러한 결과는 ECE-JLS100과 ECE-JLS300의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 차이에 영향을 받았을 것으로 판단된다.

**라디칼 소거 활성**

항산화제는 여러 질병의 원인과 관련된 자유 라디칼로 인한 손상으로부터 보호해준다(Devasagayam et al., 2004). DPPH 라디칼 소거능 측정은 다양한 화합물의 항산화 효능을 빠르고 간단하며 정확하게 측정할 수 있으며, 식품 및 음료 등의 항산화 활성을 평가하기 위해 많이 사용되고 있는 방법이다(Marinova & Batchvarov, 2011). Lee (2013)의 증류수, 수돗물 및 미네랄수를 이용한 오미자 추출액의 이화학적 품질을 평가한 연구에 따르면, 미네랄수를 이용한 오미자 추출물의 DPPH 소거능이 가장 높은 것으로 보고되어 있다. 또한 홍조류, 녹조류 및 갈조류 등 여러 해조류의 항산화 평가 연구에서 갈조류인 *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus*와 *Ascophyllum nodosum*이 가장 우수한 산

소 라디칼 흡수능과 DPPH 소거 활성을 나타냈다고 보고 되어 있다(Wang et al., 2009). ECE-JLS의 농도에 따른 DPPH 라디칼 및 hydrogen peroxide 소거능은 양성 대조군인 0.25 mg/mL의 NAC (각각 96.5±0.1, 82.1±5.1%)에 비해 적지 않은 활성을 나타내었다(Fig. 1). ECE-JLS100 및 ECE-JLS300은 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도에서 각각 85.4±0.1, 95.5±0.3, 96.7±3.3, 109.2±8.5% 및 82.8±0.1, 96.4±0.3, 96.3±1.5, 101.2±10.6%의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다(Fig. 1A, B). ECE-JLS100 및 ECE-JLS300은 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도에서 각각 82.3±0.4, 93.9±1.1, 97.5±2.2, 100.9±1.8% 및 80.7±0.2, 94.0±0.2, 101.0±1.8, 102.5±1.0%의 hydrogen peroxide 소거활성을 보였으며 농도의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1C, D).

**ECE-JLS의 세포독성**

MTT assay는 MTT 시약이 세포 내로 흡수되어 보라색의 불용성 포르마잔(formazan)으로 환원시키는 미토콘드리아의 활성을 측정하는 방법으로, 세포 생존을 측정에 사용되는 대표적인 방법이다. ECE-JLS의 세포 독성 결과는 Fig. 2에

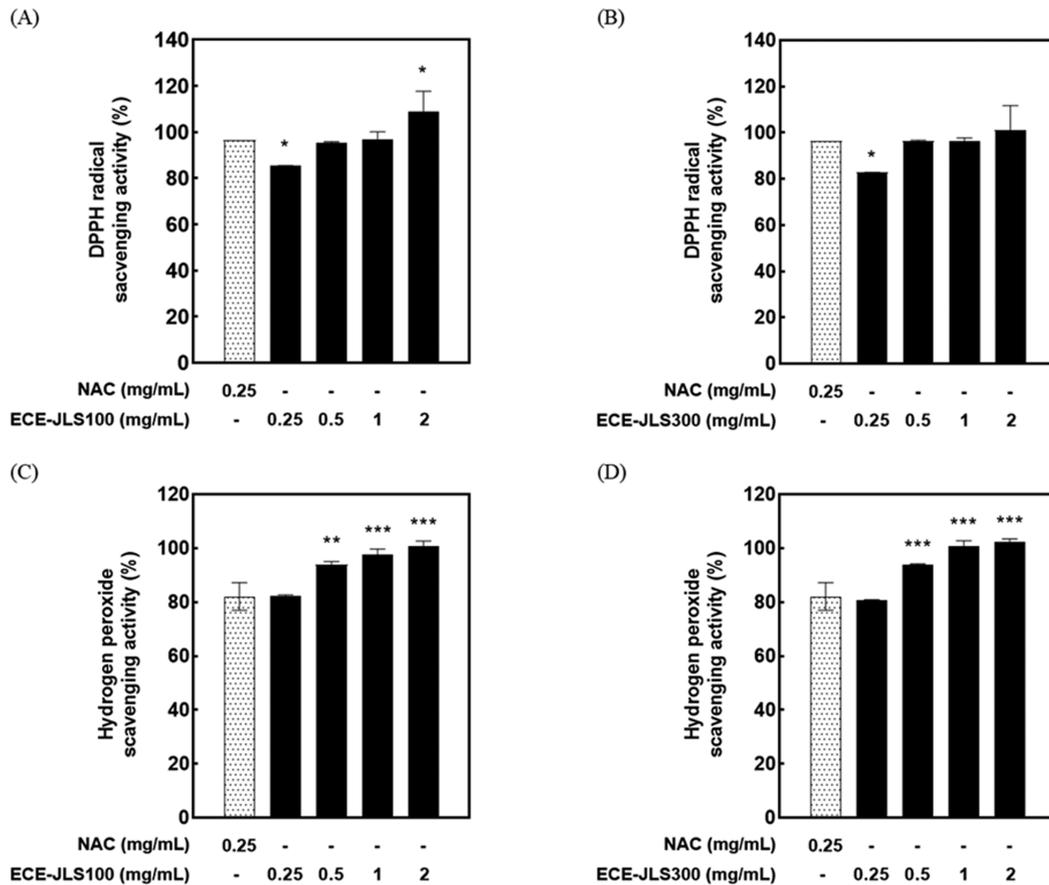


Fig. 1. DPPH radical and hydrogen peroxide scavenging activity of ECE-JLS with reference to NAC as positive control. DPPH radical scavenging activity of ECE-JLS 100 (A) and 300 (B). Hydrogen peroxide scavenging activity of ECE-JLS 100 (C) and 300 (D). ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater; NAC, *N*-acetyl cysteine. Data represent the means±S.D. from triplication. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, when compared the NAC with the other samples.

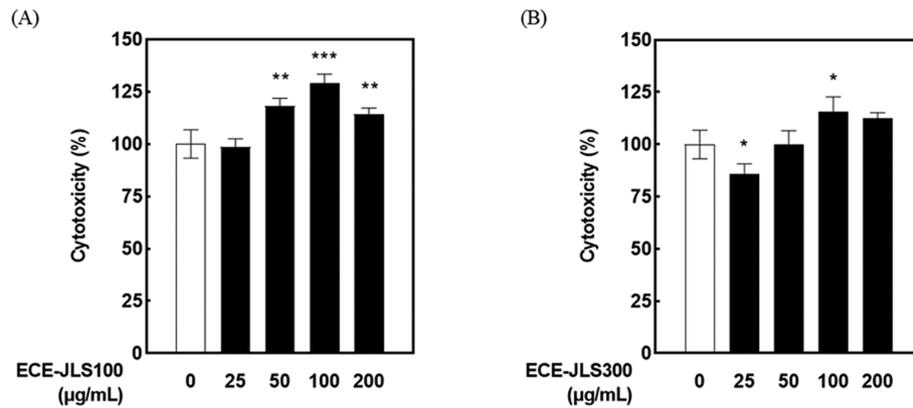


Fig. 2. Cytotoxicity of ECE-JLS in Vero cells. ECE-JLS100 (A), ECE-JLS300 (B). ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater. Data represent the means±S.D. from triplication. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  when compared with non-treated cells.

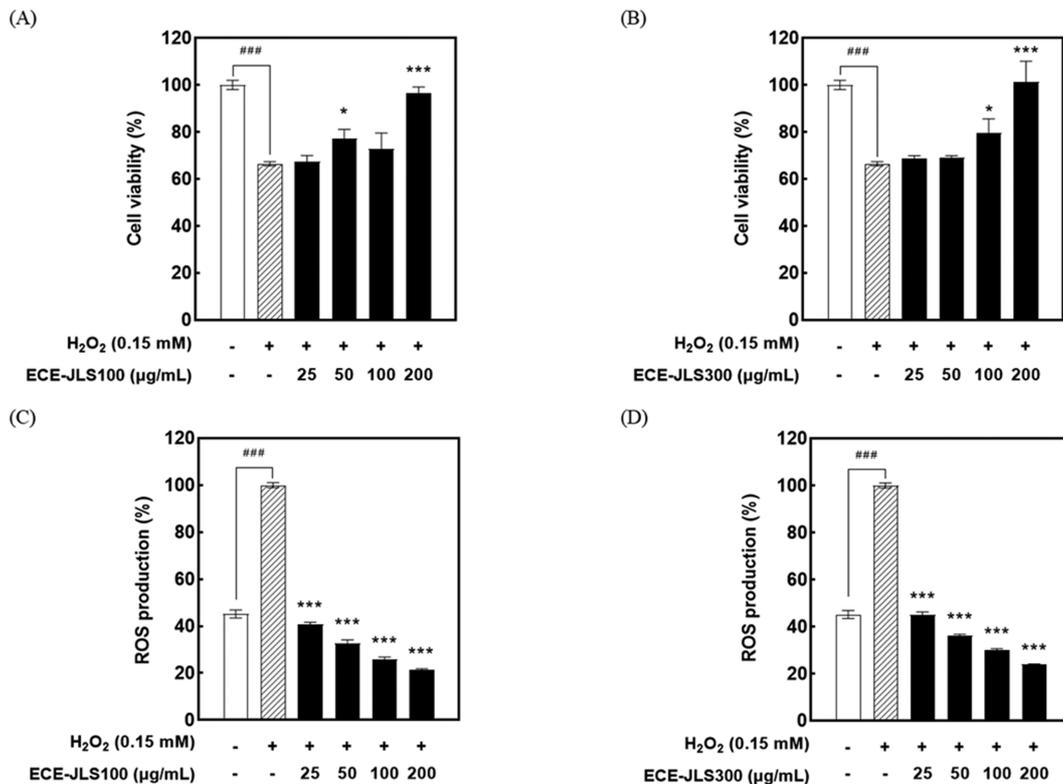


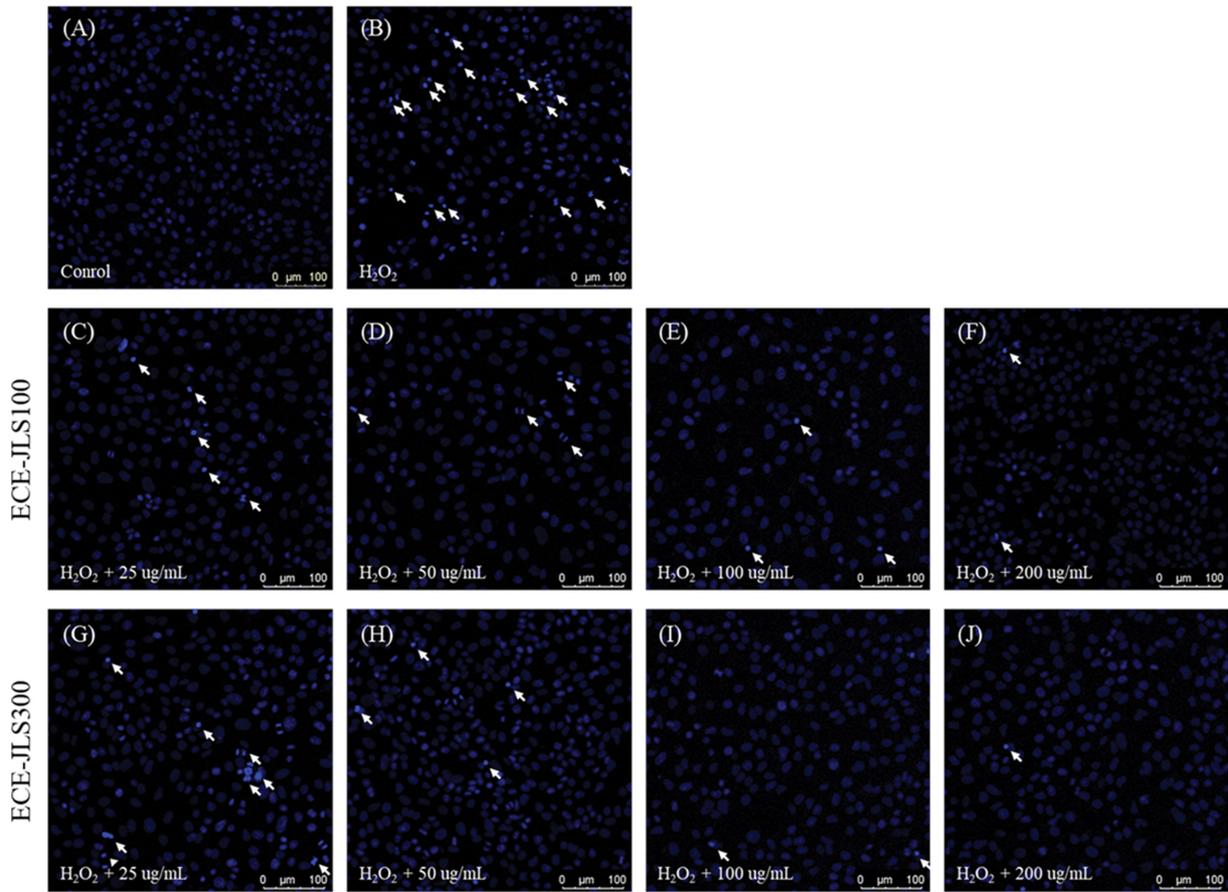
Fig. 3. Effect of ECE-JLS on ROS levels in  $H_2O_2$ -induced Vero cells. Cell viability, ROS generation of ECE-JLS-pretreated  $H_2O_2$ -induced Vero cells. Cell viability of ECE-JLS 100 (A) and 300 (B). ROS generation of ECE-JLS 100 (C) and 300 (D). ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater; ROS, reactive oxygen species. Data represent the means±S.D. from triplication. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , when compared with  $H_2O_2$ -treated cells, ### $P<0.001$ , when compared non-treated cells with  $H_2O_2$ -treated cells.

나타내었다. Vero 세포에서 추출물을 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각각 처리하여 독성이 없음을 확인하였고 이후 위 농도로 실험을 수행하였다.

#### $H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유도한 Vero 세포에서 ECE-JLS의 항산화 효과

$H_2O_2$ 로 산화 유도된 Vero 세포에 ECE-JLS를 농도 별로 처리하여 세포 생존율 및 ROS 생성을 측정하였다. 그 결

과, ECE-JLS가  $H_2O_2$ 에 의한 산화적 스트레스에 대한 농도 의존적인 세포 보호효과가 있음을 확인하였다(Fig. 3A, B). 세포 보호효과와 마찬가지로 ECE-JLS는  $H_2O_2$  산화에 의한 ROS 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.  $H_2O_2$  처리군에 비해 ECE-JLS100은 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $40.9\pm 0.7$ ,  $32.7\pm 1.5$ ,  $26.0\pm 0.9$ ,  $21.4\pm 0.4\%$ 의 ROS를 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 3C). 또한, ECE-JLS300은 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각,  $45.1\pm 1.2$ ,



**Fig. 4. ECE-JLS protects Vero cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. The apoptotic body formation was observed using Hoechst 33342 staining method under a fluorescence microscope. Non-treated cells (A), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells (B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated cells treated with ECE-JLS 100 (C-F), 300 (G-J). ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater.**

36.4±0.4, 30.2±0.5, 23.9±0.3%의 ROS를 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 3D). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 Vero 세포에서 Hoechst 33342 염색 후 핵 형태를 관찰한 결과, ECE-JLS를 전처리한 세포에서 농도 의존적으로 세포사멸이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 ECE-JLS가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 Vero 세포에서 우수한 세포 보호 효과와 ROS 생성 억제 효과가 있음을 확인하였다. 이전 연구에 따르면 감태에서 추출한 플로로탄닌, phlorofucofuroeckol-A 등이 ROS 소거능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Heo et al., 2005; Lee et al., 2013a). 이러한 폴리페놀이 ECE-JLS에도 함유되어 있어 항산화 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

**Raw 264.7 세포에서 ECE-JLS의 NO 및 TNF-α 생성 저해 활성**

ECE-JLS의 항염증 활성은 LPS로 자극된 Raw 264.7 세포를 사용하여 측정하였다. LPS 처리군에 비해 ECE-JLS100은 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도에서 각각 90.5±2.6, 82.6±3.3, 68.7±2.1, 55.0±2.4%로 유의하게(P<0.01) NO 생성을 감소시켰다(Fig. 5C). ECE-JLS300은 25, 50, 100,

200 µg/mL의 농도에서 각각 85.7±0.5, 79.1±2.3, 66.7±3.0, 56.5±1.8%로 유의하게(P<0.01) NO 생성을 저해하였다(Fig. 5D). 이를 통해 ECE-JLS가 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하여 효과적인 항염증 활성이 있는 것을 확인하였다. ECE-JLS가 LPS로 유도된 NO 생성을 저해하는 활성을 나타냈으므로, 전염증 사이토카인인 TNF-α의 생성을 확인하였다(Fig. 6). 그 결과 LPS를 처리하였을 때 15.34±0.73 ng/mL의 TNF-α가 분비되었으나, ECE-JLS의 처리에 의해 TNF-α의 분비가 억제된 것을 확인하였다. 따라서 ECE-JLS는 NO와 TNF-α의 생성을 효과적으로 감소시키는 활성을 나타내어 천연 항염증제로서의 가능성이 확인되었다. 다양한 in vitro 및 in vivo 실험에서 여러 페놀 화합물이 항염증 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 산화질소(NO)와 관련된 만성 염증성 질환의 치료에 효과적인 것으로 보고되어 있다(Jiang & Dusting, 2003). 또한 감태 유래 추출물의 항염증 활성은 다양하게 보고되어 있으며, 에탄올 등을 이용한 갈조류 추출물의 플로로탄닌이 LPS로 유도된 Raw 264.7 세포의 NO 및 전염증성 사이토카인 생성을 효과적으로 억제한다고 보고되었다

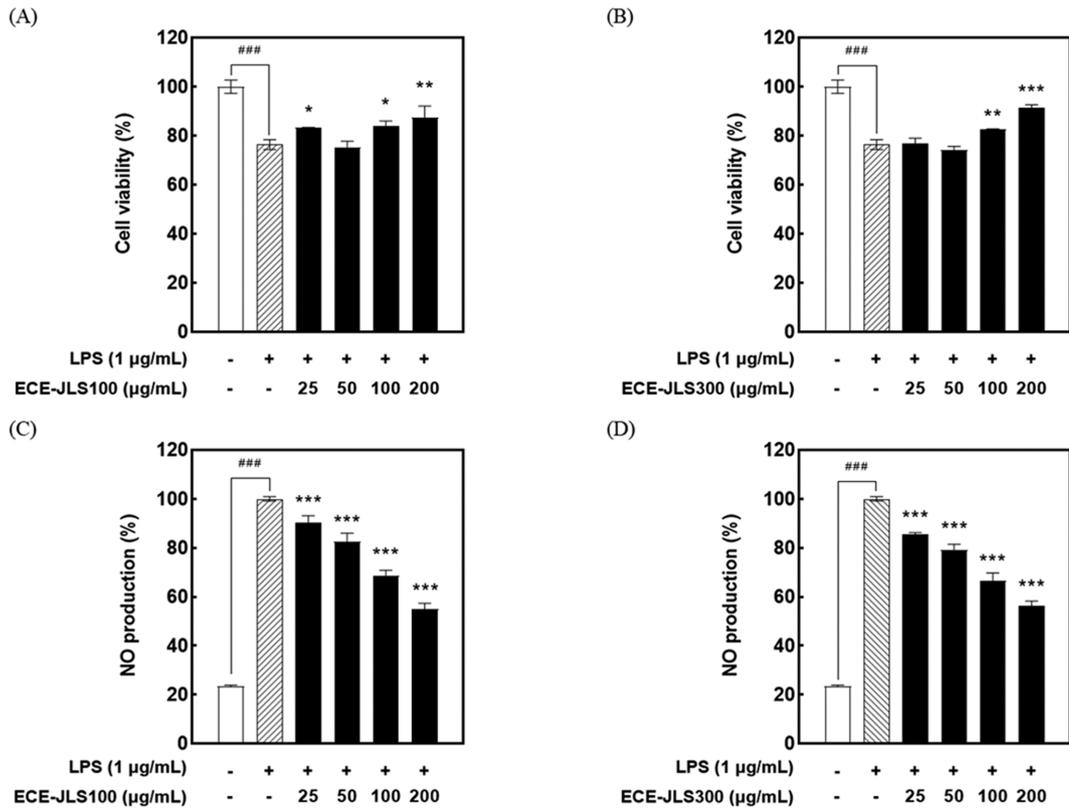


Fig. 5. Effect of ECE-JLS on cell viability and NO production in LPS stimulated Raw 264.7 cells. Cells were pre-treated with 25-200 µg/mL of ECE-JLS in the presence of LPS. Cell viability measured by WST assay and production of NO was measured in the medium of Raw 264.7 cells. Cell viability of ECE-JLS 100 (A) and 300 (B). NO production of ECE-JLS 100 (C) and 300 (D). ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater; NO, Nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide. Data represent the means±S.D. from triplication. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  when compared with  $H_2O_2$ -treated cells, ### $P<0.001$ , when compared non-treated cells with  $H_2O_2$ -treated cells.

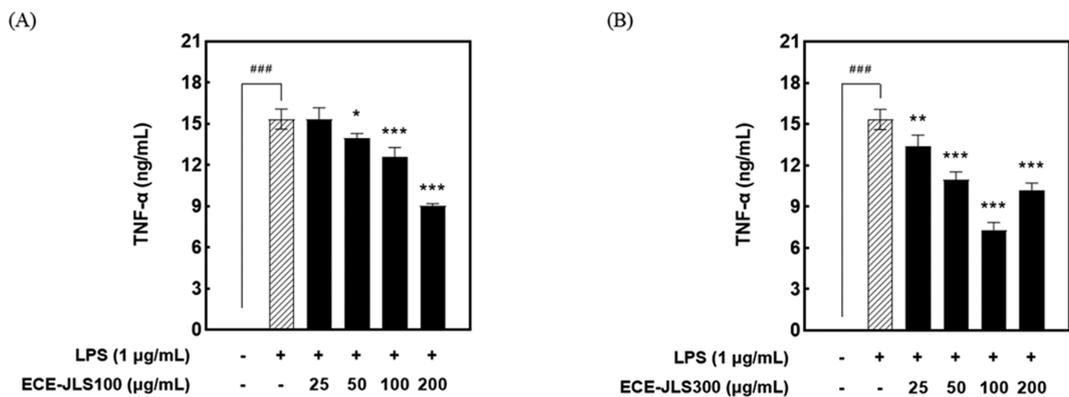


Fig. 6. Inhibitory effect of ECE-JLS on TNF-α production in LPS stimulated Raw 264.7 cells. Cells were pre-treated with 25-200 µg/mL of ECE-JLS in the presence of LPS. ECE-JLS100 (A), ECE-JLS300 (B). ECE-JLS, *Ecklonia cava* extract using Jeju lava seawater; TNF, tumor necrosis factor; LPS, lipopolysaccharide. Data represent the means±S.D. from triplication. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  when compared with LPS-treated cells, ### $P<0.001$ , when compared non-treated cells with LPS-treated cells.

(Yang et al., 2010; Lee et al., 2012a; Asanka Sanjeeewa et al., 2019). 따라서 ECE-JLS에도 플로로탄닌과 같은 폴리페놀 성분이 함유되어 있어 NO 및 TNF-α의 생성을 저해하는 것으로 판단된다.

## 요약

본 연구에서는 감태 추출 시에 용매로서 제주 용암해수의 잠재적 활용 가능성에 대해 확인하기 위하여 100, 300

mg/L 정도의 제주 용암해수를 이용하여 감태를 추출한 후, 이 추출물의 화학적 특성, 항산화 및 항염증 효능을 분석하였다. 그 결과 용암해수를 이용한 감태 추출물은 약 160 mg GAE/g 및 약 350 mg QE/g의 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유하며 우수한 DPPH 라디칼 및 hydrogen peroxide 소거능을 나타냈다. 또한, 용암해수 정도에 따른 차이는 없었으나 세포 독성에 영향을 미치지 않으면서 항산화뿐만 아니라 항염증 활성을 갖는 것을 확인하였다. 따라서 제주 용암해수를 용매로 한 감태 추출물은 향후 기능성 식품 및 화장품 개발이 가능할 것으로 기대된다. 제주 용암해수는 영양염류와 미네랄 등이 풍부하여 항비만 및 피부 보습 등의 생리활성이 우수하다고 알려져 있으며 다른 해양 수자원에 비해 채수가 용이하여 심층해양수를 대체할 수자원으로 주목받고 있다. 하지만 현재 국내에는 정도 100-500 mg/L의 제주 용암해수 제품이 판매되고 있을 뿐, 산업제품 개발 시에 발생하는 이점에 관한 실질적인 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서 제주 용암해수를 이용한 추출물의 산업적 이용 가능성을 확인하였으나, 제주 용암해수의 활발한 활용을 위해 이를 이용한 다양한 추출물의 생리활성 분석 연구 등이 지속적으로 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 2022년 산업통상자원부의 재원으로 한국산업기술진흥원의 “스마트특성화기반구축사업(P0017240)”의 지원을 받아 수행된 연구결과이다.

## References

- Ahn GN, Kim KN, Cha SH, Song CB, Lee J, Heo MS, Yeo IK, Lee NH, Jee YH, Kim JS. 2007. Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated DNA damage. *Eur. Food Res. Technol.* 226: 71-79.
- Asanka Sanjeewa K, Fernando I, Kim SY, Kim WS, Ahn G, Jee Y, Jeon YJ. 2019. *Ecklonia cava* (Laminariales) and *Sargassum horneri* (Fucales) synergistically inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammation via blocking NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Algae.* 34: 45-56.
- Chan PT, Matanju P, Yasir SM, Tan TS. 2015. Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *J. Appl. Phycol.* 27: 2377-2386.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 17: 115-120.
- Devasagayam T, Tilak J, Bolor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele R. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi.* 52: 4.
- Ding Y, Kim SH, Lee JJ, Hong JT, Kim EA, Kang DH, Heo SJ, Lee SH. 2019. Anti-melanogenesis activity of *Ecklonia cava* extract cultured in tanks with magma seawater of Jeju Island. *Algae.* 34: 177-185.
- Farasat M, Khavari-Nejad RA, BagherNabavi SM, Namjooyan F. 2013. Antioxidant properties of two edible green seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Jundishapur J. Nat. Pharma. Prod.* 8: 47-52.
- Fernando IS, Kim M, Son KT, Jeong Y, Jeon YJ. 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *J. Med. Food* 19: 615-628.
- Gabay C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 8: 1-6.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biol. Med.* 28: 1456-1462.
- Heo SJ, Ko SC, Cha SH, Kang DH, Park HS, Choi YU, Kim D, Jung WK, Jeon YJ. 2009. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol. In Vitro.* 23: 1123-1130.
- Heo SJ, Park PJ, Park EJ, Kim SK, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Ecklonia cava* by electron spin resonance spectrometry and comet assay. *Eur. Food Res. Technol.* 221: 41-47.
- Jiang F, Dusting GJ. 2003. Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 1: 135-156.
- Jung WK, Choi I, Oh S, Park SG, Seo SK, Lee SW, Lee DS, Heo SJ, Jeon YJ, Je JY. 2009. Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food Chem. Toxicol.* 47: 293-297.
- Kang J, Nam G, Yoon Y, Kim G, Bae S, Lee H, Bae S, Cha Y, Cho H, Cho H. 2021. Suppression of matrix metalloproteinase-3 expression in human dermal fibroblasts by decursin from *Angelica gigas* Nakai root extracts fermented with Jeju lava seawater. *Asian J. Beauty Cosmetol.* 19: 65-76.
- Kang SM, Kim KN, Lee SH, Ahn G, Cha SH, Kim AD, Yang XD, Kang MC, Jeon YJ. 2011. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Carbohydr. Polym.* 85: 80-85.
- Kim BY, Lee YK, Park DB. 2012. Metabolic activity of desalted ground seawater of Jeju in rat muscle and human liver cells. *Fish Aquat. Sci.* 15: 21-27.
- Kim JE, Choi YJ, Lee SJ, Gong JE, Lee YJ, Sung JE, Jung YS, Lee HS, Hong JT, Hwang DY. 2021. Antioxidant activity and laxative effects of tannin-enriched extract of *Ecklonia cava* in loperamide-induced constipation of SD rats. *PLoS One* 16: e0246363.
- Kim SY, Kim EA, Kang MC, Lee JH, Yang HW, Lee JS, Lim TI, Jeon YJ. 2014. Polyphenol-rich fraction from *Ecklonia cava* (a brown alga) processing by-product reduces LPS-induced inflammation in vitro and in vivo in a zebrafish model. *Algae.* 29: 165-174.
- Lee JH, Ko JY, Oh JY, Kim EA, Kim CY, Jeon YJ. 2013a. Evaluation of phlorofucofuroeckol-A isolated from *Ecklonia cava* (Phaeophyta) on anti-lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Algae.* 2015. 30: 313-323.
- Lee SH. 2013. Quality characteristics of Omija (*Schizandra chin-*

- ensis*) extracts with various water types. Korean J. Food Nutr. 26: 706-712.
- Lee SH, Ko CI, Ahn G, You S, Kim JS, Heu MS, Kim JI, Jee Y, Jeon YJ. 2012a. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. Carbohydr. Polym. 89: 599-606.
- Lee SH, Min KH, Han JS, Lee DH, Park DB, Jung WK, Park PJ, Jeon BT, Kim SK, Jeon YJ. 2012b. Effects of brown alga, *Ecklonia cava* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. Food Chem. Toxicol. 50: 575-582.
- Lee SH, Kang MC, Moon SH, Jeon BT, Jeon YJ. 2013b. Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from *Ecklonia cava*. Algae. 28: 371-378.
- Lee SH, Bae IH, Min DJ, Kim HJ, Park NH, Choi JH, Shin JS, Kim EJ, Lee HK. 2016. Skin hydration effect of Jeju lava sea water. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea 42: 343-349.
- Marinova G, Batchvarov V. 2011. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. Bulg. J. Agric. Sci. 17: 11-24.
- Noh JR, Gang GT, Kim YH, Yang KJ, Lee CH, Na OS, Kim GJ, Oh WK, Lee YD. 2010. Desalinated underground seawater of Jeju Island (Korea) improves lipid metabolism in mice fed diets containing high fat and increases antioxidant potential in t-BHP treated HepG2 cells. Nutr. Res. Pract. 4: 3-10.
- Park SW, Chung SK, Park JC. 2000. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O-beta-D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 106-110.
- Ryu YB, Jeong HJ, Yoon SY, Park JY, Kim YM, Park SJ, Rho MC, Kim SJ, Lee WS. 2011. Influenza virus neuraminidase inhibitory activity of phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia cava*. J. Agric. Food Chem. 59: 6467-6473.
- van Triel JJ, Arts JH, Muijsers H, Kuper CF. 2010. Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB). Toxicology 269: 73-80.
- Wang T, Jonsdottir R, Ólafsdóttir G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. Food Chem. 116: 240-248.
- Wijesinghe W, Athukorala Y, Jeon YJ. 2011. Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. Carbohydr. Polym. 86: 917-921.
- Wijesinghe W, Jeon YJ. 2012. Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: a review. Int. J. Food Sci. Nutr. 63: 225-235.
- Yang EJ, Moon JY, Kim MJ, Kim DS, Kim CS, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG. 2010. Inhibitory effect of Jeju endemic seaweeds on the production of pro-inflammatory mediators in mouse macrophage cell line RAW 264.7. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 11: 315-322.

## Author Information

- 이연지:** 한국해양과학기술원 제주연구소 연구원  
**박아름이:** 한국해양과학기술원 제주연구소 연구원  
**강나래:** 한국해양과학기술원 제주연구소 연구원  
**강도형:** 한국해양과학기술원 원장  
**허수진:** 한국해양과학기술원 제주연구소 책임연구원