pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 4, pp. 353~362 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.4.353

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

표준화된 곰피추출물의 항산화 활성 및 콜레스테롤 개선 효과

한웅호[1] · 김우혁[2] · 최선일[1] · 문효[1] · 이세정[1] · 진희구[3] · 오현지[3]
강다혜[4] · 김형빈[4] · 이부용[3] · 이옥환[1,2]*

[1]강원대학교 식품환경융합학과
[2]강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학전공
[3]차의과학대학교 식품생명공학과
[4]㈜네추럴웨이

Antioxidant and Anti-Cholesterol Activities of Standardized *Ecklonia Stolonifera* Extract

Xionggao Han[1], Woo-Hyeok Kim[2], Sun-Il Choi[1], Xiao Men[1], Se-jeong Lee[1], Heegu Jin[3], Hyun-Ji Oh[3], Dahye Kang[4], HyungBin Kim[4], Boo-Yong Lee[3], Ok-Hwan Lee[1,2]*

[1]*Department of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[3]*Department of Food Science and Biotechnology, College of Life Science, CHA University, Seongnam, Korea*
[4]*Naturalway Co. Ltd, Pocheon, Korea*

(Received August 13, 2021/Revised August 25, 2021/Accepted August 25, 2021)

ABSTRACT - *Ecklonia stolonifera*, which belongs to the family Laminariaceae, is an edible perennial brown marine alga that is widely distributed, and is rich in polyphenols, including dieckol. Here, we investigated the radical scavenging activities of *E. stolonifera* extract (ESE) using various *in vitro* models. We further evaluated the effect of ESE on the cholesterol secretion inhibition activity in HepG2 cells, as well as the hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase activity. Our results showed that the total phenol, total flavonoid, and dieckol contents of ESE were 9.64±0.04 mg GAE/g, 2.72±0.08 mg RE/g and 27.42±0.66 mg/g, respectively. The antioxidant activity of ESE increased in a dose-dependent manner. In addition, the ESE inhibited cholesterol secretion from HepG2 cells with anti-HMG-CoA reductase activity. These results suggested that ESE possesses antioxidant and anti-cholesterol activities, and can therefore be used as a preclinical bioresource for development of health functional foods.

Key words : *Ecklonia stolonifera*, Antioxidant activity, HMG-CoA reductase, Anti-cholesterol activity, Dieckol

현대사회의 급속한 산업화로 식생활이 서구화되어 지방 함량이 많고 식이섬유 함량이 적은 가공식품의 섭취 증가 및 운동 부족은 고혈압, 동맥경화, 심장병 등의 만성질환 이환율이 증가하고 있다[1]. 이러한 성인성 만성질환을 유발하는 요인 중에서 가장 주요한 위험인자로는 콜레스테롤의 농도인 것으로 보고되고 있고[2], 혈중 콜레스테롤의 수치가 감소할수록 만성질환의 이환율은 크게 감소하고 뇌졸중과 심근경색으로 인한 사망률도 감소하는 것으로 알려져 있다[3,4].

우리 몸은 식이 콜레스테롤을 흡수한 LDL 수용체, 간세포 내 콜레스테롤 합성 속도 조절 효소인 hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, 담즙산의 합성 속도 조절 효소인 cholesterol 7a-hydroxylase, 그리고 콜레스테롤을 에스테르 형태로 저장하는 acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT)가 서로 긴밀하게 연결되어 세포 내 콜레스테롤 농도를 조절하여 콜레스테롤이 축적되지 않도록 하고 있다. 그중 콜레스테롤 생합성 과정에서 HMG-CoA reductase는

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Dept. of Food Biotechnology and Environmental Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

콜레스테롤의 합성 속도를 조절하는 rate-limiting enzyme 이다. 세포 내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 sterol regulatory-element binding protein (SREBP)에 의해 HMG-CoA reductase 활성이 저해되며, 콜레스테롤 항상성 기전을 제공한다. 간조직 HMG-CoA reductase 활성의 감소는 혈중 콜레스테롤 농도 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하며 현재 HMG-CoA reductase 저해제로써 스타틴(statins) 계열의 의약품이 사용되고 있다[5,6]. 하지만 스타틴 계열의 의약품은 고요산혈증, 설사, 근육 손상, 위장 장애, 간 기능 손상 등의 부작용이 있는 것으로 보고되어[7] 최근에는 다양한 천연물로 HMG-CoA reductase 억제 활성 측정을 통해 콜레스테롤 개선 효능이 있는 기능성소재를 찾으려는 연구가 활발히 진행되고 있다[8,9].

한편, 체내에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 방어기작으로 항산화 시스템을 형성하고 있으며, 정상적인 상태에서는 ROS의 생성과 항산화 시스템간의 항상성(homeostasis)가 유지되지만 혈중 콜레스테롤 농도가 높은 상태에서에서 항산화 시스템이 항상성이 유지되지 못하여 ROS로 인한 산화적 스트레스가 증가하면 만성질환 및 심혈관 질환을 유발 가능성이 더 높은 것으로 보고되고 있다[10-12].

곰피(*Ecklonia stolonifera*)는 동해안과 남해안을 따라 분포하며, 해안선을 따라 2-10 m 수심의 해안에서 자라는 다년생의 다시마과에 속하는 갈조류로서, 우리나라에서는 다시마, 미역 등과 함께 식용으로 이용되어 왔다[13]. 곰피의 주요 기능성 성분으로는 dieckol을 비롯한 phlorotannin류인 phloroglucinol, eckol, phlorofucofuroeckol A[14,15] 및 스테롤 유래의 대사물질인 fucosterol 등이 있다[16,17]. 곰피추출물의 기능성으로는 간세포 및 급성 간 독성 보호, 알코올성 지방간 및 간 섬유화 억제, 항염증 및 혈중 지질 개선, 고혈당 완화 및 혈중 지질 산화도 저하, 장내 포도당 흡수 억제, 항균활성 등의 효과가 알려져 있다[18]. 현재, 곰피추출물은 식품의약품안전처 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등재되어 있어 간 건강에 도움을 줄 수 있는 기능성과 안전성이 입증된 소재로서 이를 활용한 다양한 기능성 평가를 통한 이중기능성에 대한 연구가 시도되고 있다.

이에 본 연구는 표준화된 곰피추출물을 대상으로 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 지표성분인 dieckol 함량을 분석하였고 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성, reducing power, FRAP 활성, 아질산염 소거활성, ORAC asaay 등의 평가를 통해 기초적인 항산화 활성을 분석하였다. 또한, 표준화된 곰피추출물의 HMG-CoA reductase 저해 활성 및 세포 내 총 콜레스테롤 생성 억제 효능을 평가하여 콜레스테롤 개선 효능이 있는 천연소재로서의 가치를 검토하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 표준화된 곰피추출물은 Naturalway Co., Ltd. (Pocheon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 곰피 추출물의 표준화 공정은 곰피 원물에 70% 주정을 첨가하여 9시간 동안 추출하고 여과, 농축한 후 동결건조하였다. 표준화된 곰피추출물의 지표성분인 dieckol 표준물질은 Avention (Incheon, Korea)에서 구입하여 사용하였고 세포배양에 사용된 시약으로 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 phosphate-buffered saline (PBS) 등은 Gibco (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 완충용액 제조와 분석에 사용되는 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 그 외의 시약은 모두 분석에 적합한 시약을 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Duval과 Shetty[19]의 방법에 따라 표준화된 곰피추출물, 2% follin-ciocalteau's phenol regent 및 10% Na_2CO_3를 1:1:1의 비율로 혼합한 후 1 시간 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정한 후 gallic acid 표준 곡선을 이용하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 표준화된 곰피추출물 0.5 mL에 95% ethanol 1.5 mL, 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 첨가하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정한 후 rutin 표준 곡선을 이용하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

표준화된 곰피추출물의 지표성분 dieckol 함량 분석

곰피추출물의 지표 성분인 dieckol의 HPLC 분석은 Bang 등[20]의 분석방법을 변형하여 측정하였으며, 분석을 위하여 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)이고 column은 Capcell pak C_{18} (250 ×4.6 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 이동상은 0.1% formic acid (A)와 acetonitrile (B)을 A;74%, B;26%의 이동상 조건으로 run time 20 min 분석하였고 검출 파장은 254 nm, 이동상 유속은 1 mL/min, 컬럼 온도 25°C, 시료 주입량은 10 μL로 설정하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능은

Ozgen 등[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 표준화된 곰피추출물을 각각 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 제조 한 후, 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시켰다. 흡광도 값은 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음 계산 방법에 의하여 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{Experiment}{Control}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거 활성 측정

7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 용액과 2.45 mM 과황산칼륨을 혼합하여 암소에서 약 16시간 반응시켰으며 734 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 희석하였다. 표준화된 곰피추출물을 각각 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 제조 한 후, ABTS용액 150 μL를 첨가하여 상온에서 20분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음식에 의하여 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었으며, ascorbic acid를 양성 대조군으로 사용하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{Experiment}{Control}\right) \times 100$$

Reducing power

Reducing power는 Oyaizu 등[22]의 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물의 수소 공유에 의해 유리 라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법으로 측정하였다. 농도별 시료 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 2.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 혼합액에 trichloroacetic acid 2.5 mL을 첨가하고, 10분간 원심분리하였다. 상층액 2.5 mL와 증류수 2.5 mL 및 0.1% Iron (III) chloride 0.5 mL을 넣어준 후 혼합하여 microplate reader를 사용하여 655 nm에서 흡광도를 측정하였다.

FRAP 활성 측정

FRAP 활성을 측정하기 위하여 Benzie 등[23]의 방법을 변형하여 측정하였다. FRAP 방법은 Fe^{3+}가 Fe^{2+}로 환원되어 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)와 결합하여 blue 계열의 색을 나타내는 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법이다. Sodium acetate와 acetic acid를 혼합하여 pH 3.6의 sodium acetate buffer를 만들고, TPTZ와 40 mM HCl을 혼합하여 10 mM TPTZ solution을 만들었다. 반응 용액을 만들기 위하여 sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ 및 20 mM $FeCl_3 6H_2O$를 10:1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 반응 용액 1.5 mL과 농도별로 희석한 시료 50 μL 및 distilled water (D.W.) 150 μL를 혼합하고, 37°C에서 4분간 반응시켜 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거 활성 측정

아질산염 소거능은 Lee 등[24]의 방법을 변형하여 측정하였다. 표준화된 곰피추출물 1 mL에 $NaNO_2$ 용액 1 mL을 가하고 0.1 M HCl을 가하여 pH를 1.2로 조정한 후 D.W.로 총량을 10 mL로 만든 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액 1 mL 취하여 2% acetic acid 5 mL, Griess 시약(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1:1) 0.4 mL을 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 15분 동안 반응시키고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL을 가하여 동일하게 행하였고 다음과 같은 계산식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{아질산염 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{Experiment}{Control}\right) \times 100$$

ORAC 지수 측정

ORAC 지수 측정은 Ou 등[25]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료는 75 mM Sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 희석하여 사용하였다. Black 96-well microplate reader (Spectra-max i3, Molecular Devices)를 이용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 37°C에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소 정도를 측정하였다. 표준물질로는 Trolox를 이용하였다.

HepG2 세포배양 및 세포독성 평가

실험에 사용된 HepG2 cell은 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포 배양을 위해 minimum essential medium (MEM)에 fetal bovine serum 10%, antibiotic-antimycotic 1%가 함유되게 첨가하여 5% CO_2, 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. HepG2 cell에 대한 표준화된 곰피추출물의 세포독성평가는 XTT {2,3-bis-(2–methoxy–4–nitro–5–sulfophenyl)-2H–tetrazolium–5-carboxanilide} assay로 측정하였다. HepG2 세포를 2×10^4 cell 농도로 96-well plate에 seeding하고 24시간 동안 안정화를 시킨 후, 곰피추출물을 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 XTT stock solution (40 μL/well)을 처리하여 37°C에서 3시간 incubation 시킨 후, microplate reader로 450/690 nm에서 흡광도 측정하였다.

표준화된 곰피추출물의 세포 내 total cholesterol 생성 억제효능 분석

곰피추출물의 세포 내 콜레스테롤 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 Chae 등[26]의 방법을 변형하여 측정하였다. HepG2 cell을 6 well culture plate에 5×10^5 cell/well로 분주하여 24시간 배양 후, FBS가 들어가지 않은 MEM media에 곰피추출물을 농도별로 24시간 처리하였다. 이후

세포 배양액을 제거한 뒤 cold phosphate-buffered saline (PBS)로 각 well을 3번 세척한 뒤 total cholesterol and cholesteryl ester colorimetric/fulorometric assay kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)에서 제공된 분석법에 따라 세포 내 콜레스테롤의 양을 측정하였다.

표준화된 곰피추출물의 HMG-CoA reductase 활성 억제 효과 분석

HMG-CoA reductase 저해 활성은 Lachenmeier 등[27]의 방법을 참고하여 HMG-CoA reductase assay kit (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 *in vitro*에서 측정하였다. HMG-CoA reductase에 의해 HMG-CoA가 mevalonate로 환원될 때 NADP가 $NADP^+$로 산화되는 정도를 340 nm에서 15분간 흡광도의 변화로 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 수행하여 평균값을 계산하였고 결과값의 통계처리는 SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 ANOVA 검정을 실시하며 Duncan의 다중 범위 검정법 (Duncan's multiple range test)으로 유의성은 $P<0.05$ 수준에서 검정하였다. 상관관계는 SPSS statistics를 이용하여 검증하였다.

Results and Discussion

표준화된 곰피추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 dieckol 함량

페놀성 화합물은 식물체에 특수한 색깔을 부여하는 2차 대사산물의 하나로서 산화-환원 반응에서 기질로 작용하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 포함하기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암, 고혈압 등의 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다[28,29]. 표준화된 곰피추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 dieckol 함량 분석 결과는 Fig. 1과 같이, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 9.64±0.04 mg GAE/g, 2.72±0.08 mg RE/g으로 나타났다. 곰피추출물의 지표성분 dieckol의 함량은 27.42±0.66 mg/g으

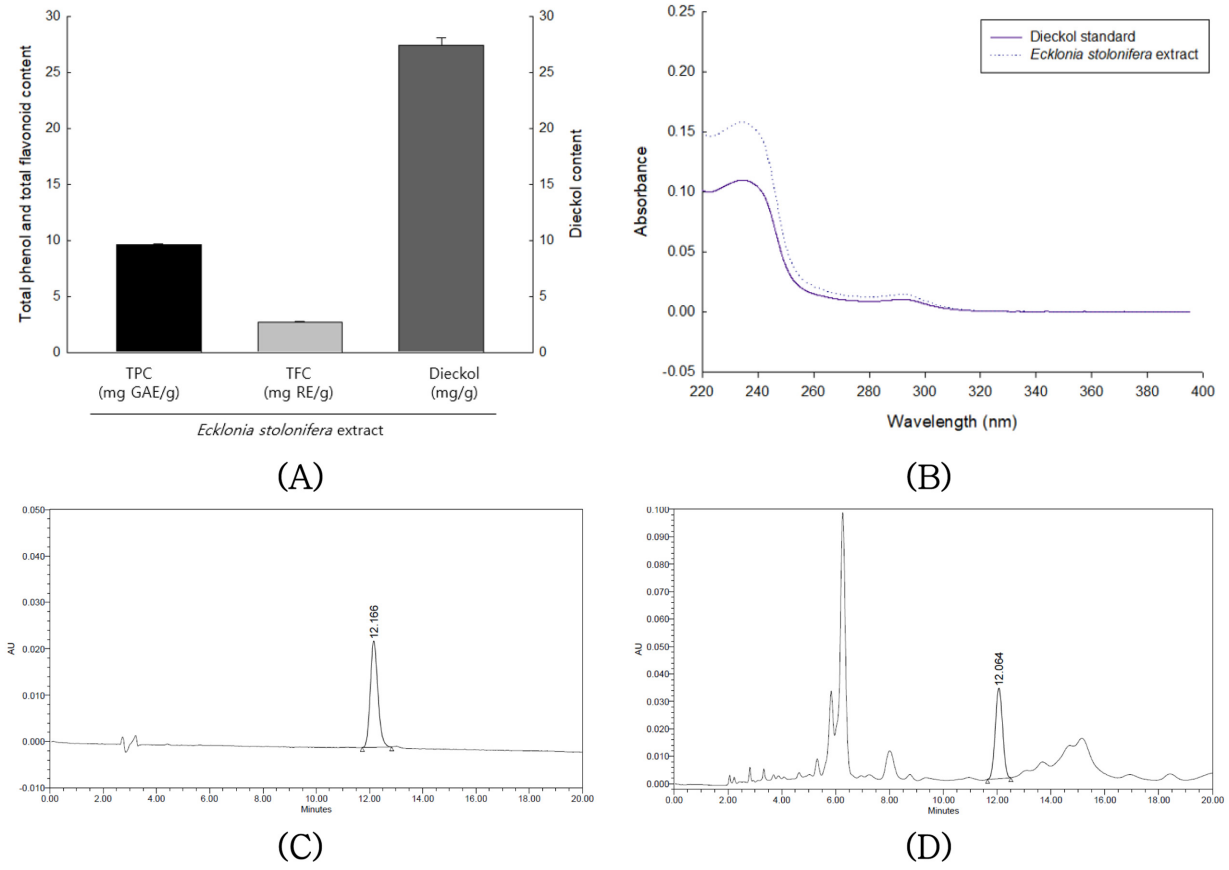

Fig. 1. Total phenol, total flavonoid and dieckol content in *ecklonia stolonifera* extract (A); PDA spectrums of dieckol (B); HPLC chromatogram of dieckol (C); and HPLC chromatogram of *ecklonia stolonifera* extract. Each value is expressed as the mean ± SD of triple determination. The other letters on the bar indicate a significant difference of $P < 0.05$ in the Duncan multi-range test.

로 측정되었다. 본 연구 결과는 산지별 해조류의 항산화 활성을 평가한 Son[30]의 연구와 비교해 볼 때 표준화된 곰피추출물의 총 페놀 함량은 미역과 다시마의 총 페놀(3.3 및 2.5 mg GAE/g) 함량보다 높았으며 Jin 등[31]의 연구에서 곰피추출물 중 dieckol의 함량은 23.7±0.21 mg/g으로 보고한 연구와 유사한 수치를 보였다. 또한, Kim 등[32]의 선행연구에서 10종 해조류 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량을 비교하였을 때 곰피추출물은 대황(*Eisenia bicyclis*) 및 감태(*Ecklonia cava*) 추출물 등과 함께 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 다른 해조류들 보다 높은 해조류로서 건강기능식품 소재로서 활용가능성이 높은 해조류로 사료된다.

표준화된 곰피추출물의 항산화 활성

표준화된 곰피추출물의 항산화 활성 평가는 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성, reducing power, FRAP 활성 등 다양한 *in vitro* 모델을 이용하여 측정하였으며 양성 대조군으로 대표적인 항산화제인 ascorbic acid (vitamin C)를 사용하여 비교하였다. DPPH 라디칼 소거능은 비교적 안정한 DPPH 라디칼이 항산화 활성을 갖는 물질의 전자공여능으로 인해 환원되면서 진보라색이 탈색되는 원리를 이용한 방법으로 라디칼 소거 활성을 비교적 간단하게 측정 할 수 있다. 표준화된 곰피추출물과 대조군으로 사용한 ascorbic acid의 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 2A에 나타내었다. 표준화된 곰피추출물의 DPPH radical 소거활성은 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL로 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거활성은 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 대조군으로 사용한 ascorbic acid는 1 mg/mL 농도에서의 DPPH 라디칼 소거능 77.76%로 가장 높은 소거활성을 보였다.

ABTS cation decolorization assay는 과황산칼륨과의 반응 의해 생성된 청록색의 ABTS radical이 항산화 물질에 의해 청색이 무색으로 환원되는 원리를 이용한 측정법이며 소수성 및 친수성에 적용할 수 있다. ABTS radical에 대한 표준화된 곰피추출물과 대조군 ascorbic acid의 항산화 활성은 Fig. 2B에 나타내었다. DPPH radical소거 활성 결과와 유사하게 표준화된 곰피추출물의 농도가 높아질수록 ABTS radical 소거활성이 증가하는 경향을 나타내었다. Reducing power의 경우에도 곰피추출물의 농도가 높아질수록 환원력이 증가하는 경향을 나타내었으며 대조군 ascrobic acid에 비해 더 높은 환원력을 확인하였다(Fig. 2C). 한편, 산화 및 환원 반응을 이용한 항산화 활성을 평가한 FRAP의 측정결과는 Fig. 2D에 나타내었다. 곰피추출물의 FRAP 활성은 DPPH 및 ABTS radical 소거활성, reducing power의 결과와 마찬가지로 농도 유의적인 항산화 활성을 보였다.

Griess 시약의 sulfanilamide와 N-1-naphylethylenediamine dihydrochloride가 NO_2와 반응하여 형성하는 azo 화합물의 흡광도를 이용하여 아질산염 소거능을 측정한 결과는 Fig. 2E과 같다. 곰피추출물의 아질산염 소거활성은 0.125, 0.25, 0.5 및 1 mg/mL 농도에서 각각 36.17%, 41.21%, 48.28% 및 74.87%로 농도 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Peroxyl 라디칼에 대한 항산화 저해능을 측정하는 방법인 ORAC value의 측정 결과는 Fig. 2F에 나타내었고 곰피추출물의 농도 유의적인 항산화력 증가를 확인할 수 있다. Kuda[33]의 연구에서 일본의 해안지역에서 수확 및 가공한 곰피의 추출물은 radical 소거능이 우수하다는 연구결과와 비교하여 본 연구의 결과는 *in vitro* 모델에서의 표준화된 곰피추출물의 우수한 항산화 활성을 증명한 결과로 사료된다.

표준화된 곰피추출물의 콜레스테롤 개선 효과

HepG2 cell에 대한 표준화된 곰피추출물의 세포독성은 Fig. 3A과 같다. 곰피추출물을 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도까지 HepG2 cell에 대해 세포독성을 나타내지 않았으며, 현미경상에서 morphology의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 표준화된 곰피추출물을 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 HepG2 cell에 처리하여 세포내 콜레스테롤 생성 억제율을 평가하여 곰피추출물의 콜레스테롤 개선 효능을 평가하였다(Fig. 3B). 곰피추출물을 100 μg/mL의 농도를 처리하였을 때 정상 대조군에 비해 55.89% 감소되었고, 양성 대조군인 Pravastatin은 100 μM 농도에서 정상 대조군에 비해 77.32% 감소되었다. 이러한 결과는 Yeo 등[34]의 *in vitro*, *in vivo* 모델에서 감태추출물과 dieckol의 항 고지혈증 관한 연구에서 감태추출물을 투여한 마우스의 혈중 콜레스테롤 수치가 감소하였고 HMG-CoA reductase 활성 억제 효능을 보인 결과와 유사한 경향으로 표준화된 곰피추출물은 활성성분인 dieckol에 의해 콜레스테롤 개선 효능이 있는 것으로 것으로 판단된다.

표준화된 곰피추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성 효과

HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 과정에 중요한 rate-limiting enzyme로써, 간에서 콜레스테롤 주요 합성 단계인 Mevalonate의 합성에 관여한다. HMG-CoA reductase의 저해는 체내의 콜레스테롤 농도를 감소시키고, LDL-receptor의 발현이 증가시켜 혈액 콜레스테롤의 세포내 유입을 증가하고, 혈중 콜레스테롤 농도의 저하시킬 수 있다. 본 연구에서 곰피추출물(12.5, 25, 50, 100 μg/mL)과 양성 대조군으로 스타틴 계열의 atorvastatin (100 μM)을 사용하여 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정하였다(Fig. 3C). 곰피추출물의 경우, 가장 은 농도인 100 μg/mL에서 41.89%의 HMG-CoA reductase 저해활성을 보였다. 이러한 결과는 최근 Chae 등[35]의 연구에서 보고된 바와 같이 성숙시기별 블랙라즈베리 추출물의 HMG-CoA reductase

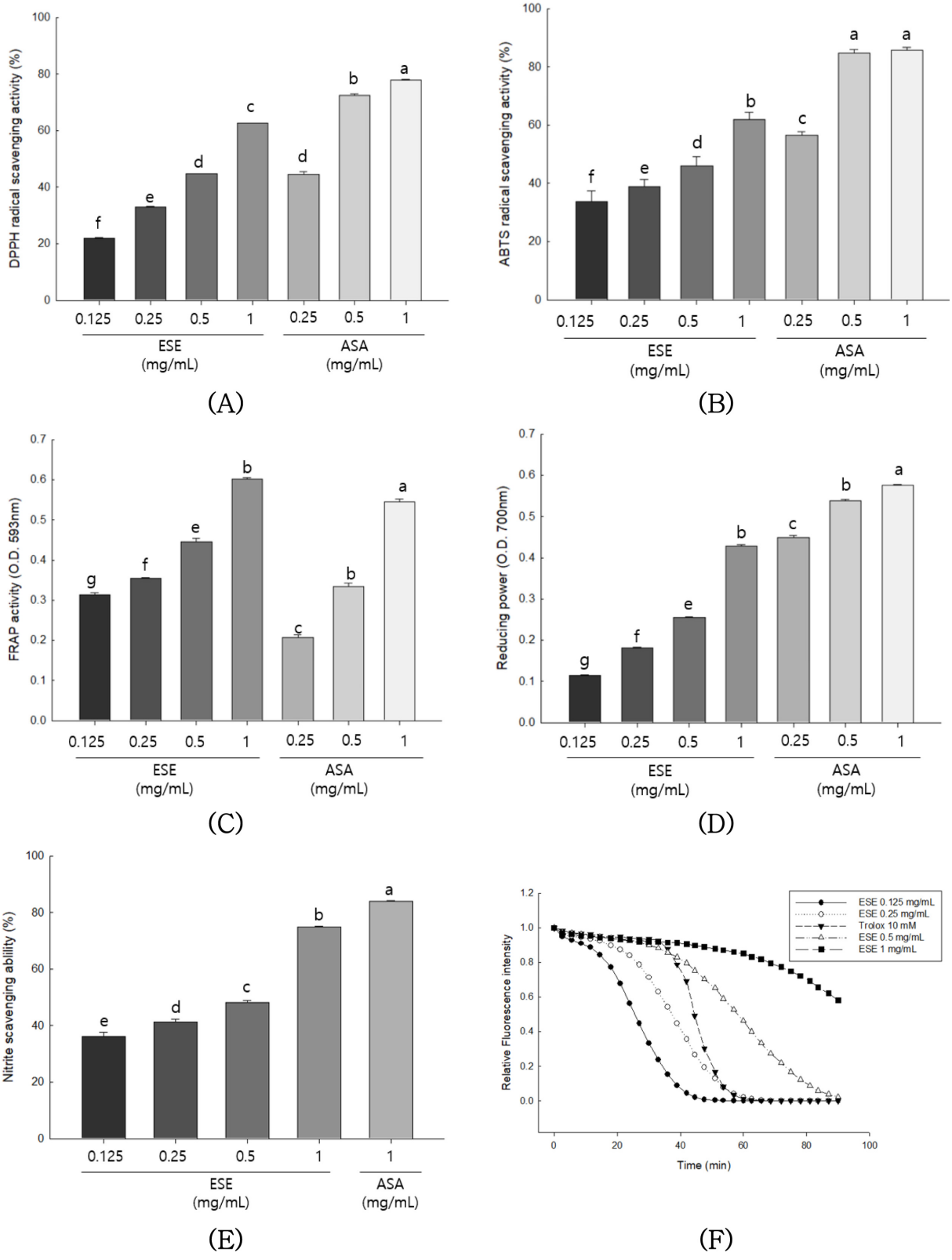

Fig. 2. The antioxidant activity of *ecklonia stolonifer* extract (ESE) and ascorbic acid (ASA) was evaluated through 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging (A), 2,2′-azino-bis (3 -ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging (B), reducing power (C), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) activities (D), nitrite scavenging ability (E), and ORAC (F). Each value is expressed as the mean ± SD of triple determination. The other letters on the bar indicate a significant difference of $P<0.05$ in the Duncan multi-range test

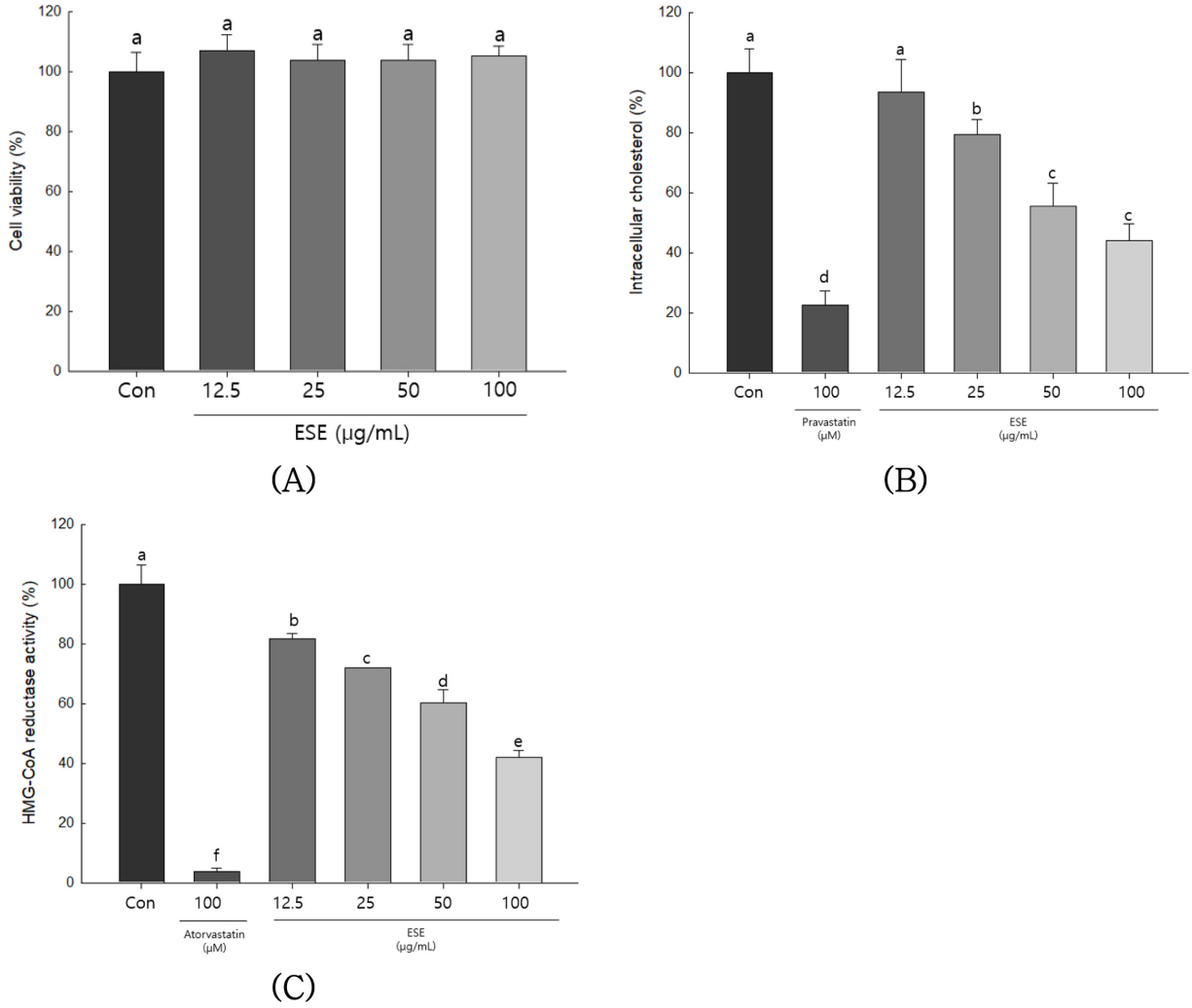

Fig. 3. Effect of *ecklonia stolonifera* extract (ESE) on cell viability (A), intracellular cholesterol (B), HMG-CoA reductase activity (C). Each value is expressed as the mean±SD of triple determination. The other letters on the bar indicate a significant difference of $P<0.05$ in the Duncan multi-range test.

Table 1. Correlation coefficient between total phenol content, total flavonoid content and antioxidant, intracellular cholesterol(IC), HMG-CoA(HMG) reductase activities of *ecklonia stolonifera* extract

	TP	TF	DPPH	ABTS	Reducing Power	FRAP	$NaNO_2$	ORAC	IC	HMG
TP	1	.994**[1)]	.997**	.957**	.999**	.999**	.990**	.970**	-.922**	-.994**
TF	-	1	.994**	.947**	.990**	.994**	.979**	.977**	-.932**	-.989**
DPPH	-	-	1	.959**	.993**	.999**	.978**	.978**	-.947**	-.998**
ABTS	-	-	-	1	.960**	.962**	.944**	.894**	-.887**	-.970**
Reducing Power	-	-	-	-	1	.996**	.995**	.958**	-.904**	-.991**
FRAP	-	-	-	-	-	1	.984**	.975**	-.935**	-.996**
$NaNO_2$	-	-	-	-	-	-	1	.936**	-.860**	-.974**
ORAC	-	-	-	-	-	-	-	1	-.966**	-.967**
IC	-	-	-	-	-	-	-	-	1	.946**
HMG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

[1)] $^{**}P<0.01$

저해 활성은 항산화성분에 기인한다는 연구내용과 유사한 경향으로 사료된다. 또한 Jo 등[36]의 연구에서 고지방 및 고콜레스테롤 식이를 섭취한 마우스에 다시마 추출물을 투여한 결과, 마우스 체내에서 활성산소종 생성 단백질의 발현 저감 및 HMG-CoA reductase의 단백질 발현이 감소되었다는 보고와도 유사한 경향으로 사료된다.

상관관계 분석

본 연구에서 측정한 표준화된 곰피추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량과 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, reducing power, FRAP 활성, HMG-CoA reductase 저해 활성, 세포 내 cholesterol 생성 억제활성 간의 상관관계를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, reducing power, FRAP 활성, 아질산염 소거활성, ORAC 지수 사이의 상관관계에서 높은 양(+)의 상관성(R^2=0.894-0.999, P<0.01)을 나타내었으며, HMG-CoA reductase 저해활성과 세포 내 cholesterol 생성 억제활성의 상관성은 R^2=0.946로 유의적(P<0.01)으로 높은 상관관계를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 표준화된 곰피추출물에 함유되어 있는 페놀성 화합물이 항산화 효과에 많은 기여를 하고 있을 뿐만 아니라 콜레스테롤 개선 효과에도 높은 상관관계가 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2021년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(곰피추출물을 이용한 체지방 감소 개별인정형 소재 개발 및 제품 상용화).

국문요약

본 연구에서는 표준화된 곰피추출물의 항산화 및 콜레스테롤 개선에 대한 효능평가를 통해 건강기능식품 소재로서의 가치를 검토하기 위해 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 dieckol 함량을 측정하였으며 DPPH, ABTS radical 소거능, reducing power 및 FRAP 활성을 통하여 곰피추출물의 *in vitro* 항산화 활성을 조사하였고 표준화된 곰피추출물의 HMG-CoA reductase 저해 활성 및 세포 내 콜레스테롤 생성 억제 효능을 평가하였다. 표준화된 곰피추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 dieckol 함량은 각각 9.64±0.04 mg GAE/g, 2.72±0.08 mg RE/g, 27.42±0.66 mg/g으로 나타났다. 표준화된 곰피추출물의 *in vitro* 항산화활성, HMG-CoA reductase 저해활성 및 세포 내 콜레스테롤 생성 억제 효능은 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 이는 표준화된 곰피추출물에 함유되어 있는 페놀성 화합물에 기인된 효능으로 사료되며 항산화성분, 항산화효과, 콜레스테롤 개선 효능간의 상관관계가 있음을 확인하였다. 향후, 표준화된 곰피추출물에 대한 in vivo 모델에서의 전임상 연구 및 작용기전 입증되면 인체적용시험을 통해 이중기능성을 갖는 건강기능식품의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Xionggao Han https://orcid.org/0000000250577401
Woo-Hyeok Kim https://orcid.org/0000000277549048
Sun-Il Choi https://orcid.org/0000000174006286
Xiao Men https://orcid.org/0000000311015796
Se-jeong Lee https://orcid.org/0000000187387559
Heegu Jin https://orcid.org/0000000241014017
Hyun-Ji Oh https://orcid.org/0000000246912772
Dahye Kang https://orcid.org/0000000271573362
HyungBin Kim https://orcid.org/0000000347778541
Boo-Yong Lee https://orcid.org/0000000273481859
Ok-Hwan Lee https://orcid.org/0000000168553136

References

1. Lee, S.J., Park, J.Y., Nam, C.M., Jee, S.H., The prevalence estimation of metabolic syndrome and it's related factors based on data from general health medical examination: A multi-center study. *J. Health Info. Stat.,* **33** 119-134 (2008).
2. National Institutes of Health (NIH). Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. *JAMA*, **253**, 2080-2086 (1985).
3. Ebrahim, S., Sung, J.H., Song, Y.M., Ferrer, R.L., Lawlor, D.A., Smith, G.D., Serum cholesterol, haemorrhagic stroke, ischaemic stroke, and myocardial infarction: Korean national health system prospective cohort study. *BMJ*, **333**, 22-27 (2006).
4. Tyrovolas, S., Panagiotakos, D.B., The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: A systematic review. *Maturitas*, **65**, 122-130 (2010).
5. Qureshi, A.A., Abuirmeileh, N., Din, Z.Z., Elson, C.E., Burger, W.C., Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. *Lipids*, **18**, 343-348 (1983).
6. Sirtory, C.R., Pharmacology and mechanism of action of the new HMG CoA reductase inhibitors. *Pharmcol. Res.*, **22**, 555-563 (1990).
7. Brown, S.L., Lowered serum cholesterol and low mood. *BMJ*, **313**, 637-638 (1996).
8. Shin, M.K., Han, S.H., Effects of methanol extracts from bamboo (*P seudosasa uaponica* Makino) leaves extracts on

lipid metabolism in rats fed high fat and high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Cult.,* **17** 30-36 (2002).
9. Kim, T.H., Son, Y.K., Hwang, K.H., Kim, M.H., Effects of Angelica keiskei Koidzumi and turmeric extract supplementation on serum lipid parameters in hypercholesterolemic diet or P-407-induced hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **37**, 708-713 (2008).
10. Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, I., Oktay, M., Küfrevioğlu, O.I., In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacol. Res.,* **44**, 491-494 (2001).
11. Stranahan, A.M., Cutler, R.G., Button, C., Telljohann, R., Mattson, M.P., Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. *J. Neurochem.*, **118**, 611-615 (2011).
12. Kim, M.K., Cho, S.W., Park, Y.K., Long-term vegetarians have low oxidative stress, body fat, and cholesterol levels. *Nutr. Res. Pract.*, **6**, 155-161 (2012).
13. Manandhar, B., Wagle, A., Seong, S.H., Paudel, P., Kim, H.R., Jung, H.A., Choi, J.S., Phlorotannins with potential anti-tyrosinase and antioxidant activity isolated from the marine seaweed *ecklonia stolonifera*. *Antioxidants,* **8**, 240 (2019).
14. Goo, H.R., Choi, J.S., Na, D.H., Quantitative determination of major phlorotannins in *ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.*, **33**, 539-544 (2010).
15. Kang, H.S., Chung, H.Y., Kim, J.Y., Son, B.W., Jung, H.A., Choi, J.S., Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch. Pharm. Res*. **27**, 194–198 (2004).
16. Choi, J.S., Han, Y.R., Byeon, J.S., Choung, S.Y., Sohn, H.S., Jung, H.A., Protective effect of fucosterol isolated from the edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and Eisenia bicyclis, on tert-butyl hydroperoxide- and tacrine-induced HepG2 cell injury. *J. Pharm. Pharmacol.,* **67,** 1170–1178 (2015).
17. Park, E.Y., Kim, E.H., Kim, M.H., Seo, Y.W., Lee, J.I., Jun, H.S., Polyphenol-rich fraction of brown alga *Ecklonia cava* collected from Gijang, Korea, reduces obesity and glucose levels in high-fat diet-induced obese mice. *Evid. Based complement. Alternat. Med.*, 2012, 418912 (2012).
18. Yu, S.M., Kim, W.K., Health beneficial effects of brown algae *ecklonia stolonifera* in liver. *Food Sci. Ind.*, **51**, 334-342 (2018).
19. Duval, B., Shetty, K., The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. *J. Food Biochem.,* **25**, 361-377 (2007).
20. Bang, C.Y., Byun, J.H., Choi, H.K., Choi, J.S., Choung, S.Y., Protective effects of Ecklonia stolonifera extract on ethanol-induced fatty liver in rats. *Biomol. Ther.*, **24**, 650-658 (2016).
21. Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio Jr, A.Z., Scheerens, J.C., Miller A.R., Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2' diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1151-1157 (2006).
22. Oyaizu, M., Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, **44**, 307-315 (1986).
23. Benzie, I.F., Stranin, J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal. Biochem*., **239**, 70-76 (1996).
24. Lee, S.J., Shin, J.H., Kang, M.J., Jung, W.J., Ryu, J.H., Kim, R.J., Sung, N.J., Antioxidants activity of aged red garlic. *J. Life Sci.,* **20**, 775-781 (2010).
25. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem*. **49,** 4619-4626 (2001).
26. Chae, K.S., Lee, S.J., Gim, S.W., Cho, S.W., Kwon, J.W., Kim, Y.S., Improvement in antioxidant activities and cholesterol secretion inhibition abilities of black raspberry extracts upon maturation. *Korean J. Food Preserv.*, **27**, 325-332 (2020).
27. Lachenmeier, D.W., Monakhova, Y.B., Kuballa, T., Löbell-Behrends, S., Maixner, S., Kohl-Himmelseher, M., Waldner, A., Steffen, C., NMR evaluation of total statin content and HMG-CoA reductase inhibition in red yeast rice (Monascus spp.) food supplements. *Chin. Med.*, **7**, 1-7 (2012).
28. Hallivell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I., The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.,* **33**, 601-617 (1995).
29. Kim, H.J., Jun, B.S., Kim, S.K., Cha, J.Y., Cho, Y.S., Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (Carthamus tinctorius L). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **29**, 1127-1132 (2000).
30. Son, H.J., Studies on the Antioxidant Activity and Metal-Chelating Ability of Seaweed by the Cultivating Locations. MS thesis, Kosin University, Busan, Korea (2007).
31. Jin, H.G., Lee, K.P., Chei, S.W., Oh, H.J., Lee, K.P., Lee, B.Y., Ecklonia stolonifera Extract Suppresses Lipid Accumulation by Promoting Lipolysis and Adipose Browning in High-Fat Diet-Induced Obese Male Mice. *Cells*, **9**, 871 (2020).
32. Kim, J.H., Kang, H.M., Lee, S.H., Lee, J.Y., Park, L.Y., Antioxidant and α-glucosidase inhibition activity of seaweed extracts. *Korean J. Food Preserv.*, **22**, 290-296 (2015).
33. Kuda, T., Kunii, T., Goto, H., Suzuki, T., Yano, T., Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and Ecklonia kurome products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chem.*, **103**, 900-905 (2007).
34. Cerqueira, N.M.F.S.A., Oliveira, E.F., Gesto, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., Cholesterol biosynthesis: A mechanistic overview. *Biochemistry*, **55**, 5483-5506 (2016).
35. Yeo, A.R., Lee, J., Tae, I.H., Park, S.R., Cho, Y.H., Lee, B.H., Shin, H.C., Kim, S.H., Yoo, Y.C., Anti-hyperlipidemic

effect of polyphenol extract (Seapolynol™) and dieckol isolated from *Ecklonia cava* in *in vivo* and *in vitro* models. *Prev. Nutr. Food Sci.*, **17**, 1–7 (2012).
36. Jo, H.G., Kim, M.J., Cheong, S.H., Sea tangle (*Saccharina japonica*), an edible brown seaweed, improves serum lipid profiles and antioxidant status in rats fed high-fat and high-cholesterol diets. *J. Appl. Phycol.*, **31**, 3957-3967 (2019).