

## Antioxidant Activities of Extracts from Fermented Mulberry (*Cudrania tricuspidata*) Fruit, and Inhibitory Actions on Elastase and Tyrosinase

Dae-Hun Kang<sup>1</sup>, Jae-Won Kim<sup>2</sup> and Kwang-Sup Youn<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Sangro Co. Ltd., Gyeongsan 712-702, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

### 꾸지뽕열매 발효 추출물의 항산화 특성과 Elastase 및 Tyrosinase 저해활성

강대훈<sup>1</sup> · 김재원<sup>2</sup> · 윤광섭<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(주)상로, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 식품가공학전공

#### Abstract

We evaluated the nutritional value of 70% ethanol extracts (EE) from fermented *Cudrania tricuspidata* fruit (ECT: EE of *C. tricuspidata*, EFCT: EE of fermented *C. tricuspidata*, EFCTL: EE of fermented *C. tricuspidata* by *B. licheniformis*, EFCTS: EE of fermented *C. tricuspidata* by *B. subtilis*) by determined the total polyphenol and flavonoid contents, antioxidant activities, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. The yields of freeze-dried powder of ECT, EFCT, EFCTL, and EFCTS were 54.22%, 54.43%, 57.51%, and 57.23% (each w/w), respectively. The color of L\*, a\*, b\* values decreased of fermented *Cudrania tricuspidata*. The fermented EFCTL and EFCTS had relatively higher contents of total polyphenol and flavonoid than those of other extracts. ABTS radical scavenging ability were 94.61%, 95.85%, 94.36%, and 96.69%, respectively. SOD (superoxide dismutase)-like activities were in the order EFCT (32.60%) > EFCTS (27.10%) > EFCTL (23.30%) > ECT (22.00%), and nitrite scavenging activity was in order of EFCTS (51.18%) > EFCTL (45.61%) > EFCT (41.93%) > ECT (27.76%), respectively. Ferrous ion chelating activity of EFCTL (67.34%) and EFCTS (60.36%) was significantly the highest, whereas ECT (52.34%) and EFCT (51.73%) had not different significantly. Xanthine oxidase, elastase and tyrosinase inhibitory activities at 0.5% (w/v) solutions of EFCTL and EFCTS were somewhat higher than those of non-fermented ECT. In conclusion, we provide experimental evidence that extracts of fermented *Cudrania tricuspidata* of *B. subtilis* and *B. licheniformis* exhibited higher antioxidant activities and inhibitory actions on elastase and tyrosinase compared with non fermented *Cudrania tricuspidata*.

Key words : antioxidant, mulberry, elastase, tyrosinase, *B. subtilis*, *B. licheniformis*

#### 서 론

생활환경과 식생활의 서구화로 암, 심장질환, 동맥경화, 고혈압 등과 같은 다양한 생활습관병이 증가하고 있다. 이러한 질병의 원인으로 superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl (OH), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 및 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등과 같은 free radical과의 관련성이 대두됨에 따라 이들에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호하고 노화를 예방하기 위한 항산화 방어계를 강화시키는 생리활성 물질

의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다.

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 예로부터 나무 잎, 줄기, 뿌리는 습진, 폐결핵, 만성 요통, 타박상, 급성관절염 등의 한방치료에 사용되었으며, 동의보감에서는 꾸지뽕 열매가 강장, 자양, 숙취해소, 간과 신장보호효과 등이 있는 것으로 보고되었다(1). 또한 항균 및 항산화 작용(2), 항당뇨(3), 항고지혈증(4), 항고혈압(5), 항세포독성(6) 등 주로 다양한 기능성 소재활용에 관한 연구가 보고되었다. 최근 꾸지뽕 열매 당단백질을 활용한 생리활성이 보고되고 있으나(7) 발효를 통한 bioconversion으로 기능성을 증대시킨 연구는 전무한 실정이다.

전통발효식품에 관여하는 고초균은 호기성 균으로 다양

\*Corresponding author. E-mail : ksyoun@cu.ac.kr  
Phone : 82-53-850-3209, Fax : 82-53-850-3209

한 가수분해효소를 생산하면서 콩 발효식품에 크게 기여하고 있다. 발효과정을 거치면서 고초균에 의해 단백질 가수분해 효소, 탄수화물 가수분해 효소, 혈전분해 효소, 기능성 펩타이드 및 고분자 점질물 등의 생리활성물질을 생산한다(8). 발효숙성 시 고초균이 생산하는 효소에 의하여 단백질과 당질이 분해되어 levan form fructan과 glutamic acid가 중합된 poly- $\gamma$ -glutamic acid (PGA)로 구성된 끈끈한 점질물이 생성되며(9), 이러한 점질물은 발효제품의 품질특성에 중요한 영향을 미친다. 특히 PGA는 미생물 고분자물질의 일종으로 면역증진 효과, 항암효과 등의 생리활성기능을 가지고 있으며 식품, 의약품뿐만 아니라 보습성도 뛰어나 화장품으로도 각광받고 있는 기능성 소재로 보고된 바 있다(10). 또한 탄수화물과 단백질을 주로 분해하여 생성되는 생리활성 물질은 제품의 품질에 결정적인 영향을 줄뿐만 아니라 bioconversion에 따른 다당류체, 올리고당, 아미노산류, 펩타이드류, 유기산류, 폴리페놀류 등의 유효 성분의 생성 및 증가에 따라 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다(11).

본 연구자들은 재래 청국장으로부터 분리한 수종의 균주를 단일균주로 사용하여 항돌연변이 활성, 점질물, 유리아미노산 함량 및 관능검사를 행하여 우수균주로 *Bacillus licheniformis*를 선발하였으며(12), *Bacillus subtilis* 균주는 생리활성 물질인 PGA 점질물과 혈전분해효소를 생산하는 우량균주로 보고된 바 있다(13). 따라서 본 연구에서는 다양한 효능을 가지는 꾸지뽕의 이용가치를 향상시키고 아울러 새로운 약리효과를 기대하기 위하여 다량의 당과 단백질을 함유한 꾸지뽕 열매에 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus licheniformis*로 발효시킨 발효 꾸지뽕열매의 항산화 활성과 elastase 및 tyrosinase 저해활성을 측정함으로써 생리활성과 기능성 소재로서의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 균주

본 실험에서 사용된 꾸지뽕(*Cudrania tricuspidata*) 열매는 2010년 9월에 경북 경산 진량에서 수확한 열매를 주식회사 상로(Gyeong-san, Korea)에서 공급받았으며, 꾸지뽕 열매는 동결건조(FD SFDSM12, Samwon, Korea)한 다음 균질기(Nihonseili, Kaisha Ltd, Japan)를 사용하여 80 mesh로 분쇄한 후 분말을 제조하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 균주로는 한국종균협회에서 분양받은 *Bacillus subtilis* KCTC 1021와 재래청국장으로부터 우수균주로 선발된 *Bacillus licheniformis* 균주(12)를 사용하였다.

### 발효 꾸지뽕 조제

발효 꾸지뽕 제조는 각 균주(*B. subtilis* KCTC 1021, *B.*

*licheniformis*)를 멸균시킨 Bacto™ tryptic soy broth (Becton, Dickison & Co., sparks, MD, USA)에 접종하여 40°C에서 24시간 동안 배양하여 배양액( $10^9$  cells/mL)을 제조하였다. 배양액은 원심분리하여 균체를 침전시키고 다시 생리식염수로 씻어내는 작업을 2~3회 반복한 다음 각각의 균주를 0.5% (v/w)가 되게 꾸지뽕 열매 분말에 균일하게 접종하였다. 다음 플라스틱 용기(50 x 40 x 30 cm)에 1 kg씩 담은 후, 표면에 두께 0.01 mm polyethylene film을 가볍게 덮어 40°C, 상대습도 90%에서 48시간 발효시켰다. 대조군으로는 플라스틱 용기(50 x 40 x 30 cm)에 꾸지뽕 열매 분말을 15 cm 깊이로 넣은 후 40°C에서 48시간 발효시킨 분말을 대조군으로 하여 비교분석하였다.

### 꾸지뽕 및 발효꾸지뽕 열매 추출물 조제

동결건조시킨 꾸지뽕열매 및 발효시킨 각각의 꾸지뽕열매를 추출하기 위하여 70% ethanol을 사용하였다. 환류 냉각관을 부착시키고 시료 100 g에 70% ethanol을 1:8의 비율로 넣고 90°C의 맨틀 상에서 4시간씩 3회 반복 추출한 후 Whatman No. 1 여과지로 여과하였다. 다음 rotary vacuum evaporator (rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압농축한 후에 동결건조(FD SFDSM12, Samwon, Korea)하여 분말을 제조하였으며 -70°C에 저장하면서 실험에 사용하였다.

### 수분 및 색도

수분함량은 적외선 수분측정장치(IRD-250, Woori Sci Co, Korea)를 사용하여 측정하였다. 색도는 색차계(Chromameter CR-200 Minolta, Tokyo, Japan)로 측정하였으며, 밝기를 나타내는  $L^*$ (lightness), 적색도를 나타내는  $a^*$ (redness), 황색도를 나타내는  $b^*$ (yellowness) 및  $H^\circ$ (hue angle value)를 측정하였다.

### 폴리페놀 함량 측정

Dewanto 등(14)의 방법에 따라 추출물 100  $\mu$ L에 2% sodium carbonate 2 mL과 50% Folin-Ciocalteu reagent 100  $\mu$ L을 가한 후 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며 gallic acid(Sigma-Aldrich Co, USA)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

### 플라보노이드 함량 측정

Salch와 Hameed (15)의 방법에 따라 추출물 100 mL에 5% sodium nitrite 0.15 mL을 가한 후 25°C에서 6분간 방치한 다음 10% aluminium chloride 0.3 mL를 가하여 25°C에서 5분간 방치하였다. 다음 1N NaOH 1 mL를 가하고 vortex상에서 가한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며 rutin hydrate (Sigma-Aldrich Co, USA)의 검량선에 의하여 함량을 산출하였다.

#### ABTS radical 소거활성 측정

Re 등(16)의 방법에 따라 7.4 mM ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt]와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온·암소에서 24 시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 실험 직전에 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가  $0.700 \pm 0.030$ 이 되도록 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 950  $\mu$ L에 추출물 50  $\mu$ L를 가하여 암소에서 10분 간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, ABTS radical scavenging ability(%) =  $100 - [(OD \text{ of sample}/OD \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 활성을 산출하였다.

#### Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

Marklund & Marklund (17)의 방법에 따라 추출물 200  $\mu$ L에 pH 8.5로 조정된 tris-HCl buffer 용액 3 mL와 7.2 mM pyrogallol 200  $\mu$ L를 가하고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, SOD-like activity(%) =  $100 - [(OD \text{ of sample}/OD \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 활성을 산출하였다.

#### 아질산염 소거능(nitrite scavenging activity) 측정

Kato 등(18)의 방법에 따라 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1 mL에 추출물 1 mL를 가하고 0.1 N HCl과 0.2 M citrate buffer (pH 2.5)를 가하여 총 부피를 10 mL로 조정하였다. 다음에 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1 mL를 취하여 2% 초산용액 3 mL와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent (1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL을 순차적으로 가한 후 실온에서 15분간 방치, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 사용하였으며 계산식, nitrite scavenging activity(%) =  $100 - [(OD \text{ of sample}/OD \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 산출하였다.

#### Ferrous ion chelating 효과 측정

Yen 등(19)의 방법에 따라 시액 1 mL, 80% ethanol 0.8 mL, 2 mM FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O [iron(II) chloride tetrahydrate] 용액 0.1 mL, 5 mM ferrozine [3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid]용액 0.1 mL를 첨가한 다음 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 대표적 chelating agent인 EDTA를 사용하였으며 계산식, ferrous ion chelating effect(%) =  $100 - [(OD \text{ of sample}/OD \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 산출하였다.

#### Xanthine oxidase (XO) 저해활성 측정

Stirpe와 Corte의 방법(20)의 방법에 따라 추출물 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 mL에 2 mM xanthine 기질액 0.2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase

(0.2 U/mL) 0.1 mL를 가하였다. 다음에 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 종결시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였으며 계산식, xanthine oxidase inhibitory activity (%) =  $100 - [(OD \text{ of sample}/OD \text{ of control}) \times 100]$ 에 의하여 산출하였다.

#### Elastase 저해활성 측정

James (21)의 방법에 따라 0.2 M tris/HCl buffer용액(pH 8.0) 1.0 mL에 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroaniline (10.4 mM) 0.1 mL 및 추출물(T) 0.1 mL를 가한 후 25°C에서 5분간 반응시킨 다음 elastase (Pancreatic from porcine pancreas, 3-6 units/mg-protein, EC 3.4.21.36, Sigma, USA, 1  $\mu$ g/mL) 0.1 mL를 가하여 405 nm에서 0 time에서의 흡광도를 측정 한 후 다시 25°C에서 20분간 반응한 후의 흡광도를 측정하였다. 대조군(C)은 시료 대신 buffer 용액을 사용하였다. 저해활성도는 계산식, inhibitory activity (%) =  $[1 - \{T(OD \text{ 20 min} - OD \text{ 0 min})/C(OD \text{ 20 min} - OD \text{ 0 min})\}] \times 100$ 에 의하여 산출하였다.

#### Tyrosinase 저해활성 측정

Jung 등(22)의 방법에 따라 0.175 M phosphate buffer 용액 (pH 6.8) 0.2 mL, 5 mM L-DOPA용액 0.2 mL 및 추출물 0.5 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (Tyrosinase from mushroom,  $\geq 2,000$  units/mg solid, EC 1.14.18.1, Sigma, USA, 110 units/mL) 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 3분간 반응시킨후 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 저해활성은 inhibitory activity(%) =  $[1 - (S_{Abs} - B_{Abs} / C_{Abs})] \times 100$ : “S<sub>Abs</sub>; 시료의 흡광도, B<sub>Abs</sub>; 효소대신에 증류수를 넣었을 때의 흡광도, C<sub>Abs</sub>; 시료 추출액 대신에 증류수를 넣었을 때의 흡광도”에 의하여 산출하였다.

#### 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 유의성 검증은 version 12의 SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test를 행하였다.

## 결과 및 고찰

#### 수율 및 색도

꾸지뽕 및 발효 꾸지뽕열매 분말의 70% ethanol 추출물을 동결건조 하였을 때의 수율과 색도는 Table 1과 같다. 수율은 ECT (ethanol extract of *C. tricuspidata*), EFCT (thanol extract of fermented *C. tricuspidata*), EFCTL (ethanol extract

of fermented *C. tricuspidata* by *B. licheniformis*) 및 EFCTS(ethanol extract of fermented *C. tricuspidata* by *B. subtilis*)가 각각 54.22%, 54.43%, 57.71% 및 57.23%로 높은 수율을 나타내었으며, 균주 발효 시 증가하는 경향을 보였다. 식물성 polyphenolic 화합물들은 수용성 또는 지용성으로 구분되어 있어 추출되는 용매에 따라 그 성분들이 달라지기 때문에 추출 수율에 있어서도 많은 차이를 보인다(23). 80% 이상이 탄수화물 및 단백질로 구성되어 있는 꾸지뽕 열매의 경우 비극성 용매에서 잘 용출된 결과로 사료되며(7), 발효 시 효소 가수분해에 따른 수용성 및 지용성 폴리페놀 화합물과 방향족 아민 등의 용출이 증가되어 수율이 높게 나타난 것으로 판단된다(8). L\*, a\* 및 b\* 값 모두는 발효처리군 EFCT, EFCTB 및 EFCTS가 대조군 ECT에 비하여 감소하는 추세를 보인 반면 H° 값은 높은 경향을 나타내었다. 이는 발효로 인하여 탄수화물과 단백질이 분해되어 생성된 당과 아미노산의 반응인 Maillard 반응의 결과(24)와 유사한 경향을 나타내었다.

다고 하였고, Lee 등(26)은 *B. subtilis* 균주로 40°C에서 24시간 발효시킨 탈지대두 grits 발효물의 80% ethanol 추출물은 total polyphenol 및 flavonoid 함량이 발효시키기 전에 비하여 3.8~4.8배 증가한다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 균주 발효균에서 total polyphenol 및 flavonoid 함량이 증가한 현상은 발효과정 중에 분해되거나 새롭게 합성되는 성분에 의한 결과로 사료된다(8).

**Table 2. Total polyphenol and flavonoid contents of 70% ethanol extracts of fruit powder from fermented *Cudrania tricuspidata* (mg/g, dry basis)**

Measurement	ECT <sup>1)</sup>	EFCT <sup>2)</sup>	EFCTL <sup>3)</sup>	EFCTS <sup>4)</sup>
Total polyphenol	8.13±0.09 <sup>5),6)</sup>	9.53±0.15 <sup>c</sup>	11.03±0.27 <sup>b</sup>	11.90±0.37 <sup>a</sup>
Total flavonoid	1.54±0.16 <sup>b</sup>	1.73±0.07 <sup>ab</sup>	1.94±0.19 <sup>a</sup>	1.85±0.14 <sup>a</sup>

<sup>1-4)</sup>Abbreviations: See Table 1.

<sup>5)</sup>Values are means ± standard deviation of triplicate determinations.

<sup>6)</sup>Different superscripts within a row (a-d) indicate significant differences (p<0.05).

**Table 1. Yields and color of 70% ethanol extracts of fruit powder from fermented *Cudrania tricuspidata***

Samples <sup>1)</sup>	Yields (% dry basis)	Color			
		Lightness (L*)	Redness (a*)	Yellowness (b*)	Hue angle (H°)
ECT	54.22±1.51 <sup>2),3)</sup>	44.25±0.08 <sup>a</sup>	9.91±0.02 <sup>a</sup>	9.64±0.03 <sup>a</sup>	48.70±0.17 <sup>d</sup>
EFCT	54.43±1.85 <sup>a</sup>	42.61±0.38 <sup>b</sup>	8.70±0.03 <sup>c</sup>	9.09±0.02 <sup>c</sup>	50.67±0.15 <sup>b</sup>
EFCTB	57.71±1.85 <sup>a</sup>	42.68±0.03 <sup>b</sup>	9.25±0.02 <sup>b</sup>	9.23±0.03 <sup>b</sup>	49.50±0.10 <sup>f</sup>
EFCTS	57.23±2.13 <sup>a</sup>	42.99±0.11 <sup>b</sup>	7.30±0.01 <sup>d</sup>	8.98±0.02 <sup>d</sup>	54.93±0.06 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Abbreviations: ECT, ethanol extract of *C. tricuspidata*; EFCT, ethanol extract of fermented *C. tricuspidata*; EFCTL, ethanol extract of fermented *C. tricuspidata* by *B. licheniformis*; EFCTS, ethanol extract of fermented *C. tricuspidata* by *B. subtilis*.

<sup>2)</sup>Values are means ± standard deviation of triplicate determinations.

<sup>3)</sup>Different superscripts within a column (a-d) indicate significant differences (p<0.05).

**폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정**

식물에 존재하는 많은 phytochemical 중 phenol성 화합물은 그 함량이 높을수록 항산화 활성은 증가하며, 항콜레스테롤 작용, 정장작용, 항암 및 항산화 작용 등의 생리적 효과도 높아지는 것으로 알려져 있다. ECT, EFCT, EFCTL 및 EFCTS의 total polyphenol 및 total flavonoid 함량을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Total polyphenol 함량은 ECT 8.13 mg/g (w/w), EFCT 9.53 mg/g (w/w)로 발효에 의하여 17.22%가 증가하였고, 균주발효균인 EFCTL (11.03 mg/g, w/w) 및 EFCTS (11.90 mg/g, w/w)는 ECT에 비하여 각각 35.67% 및 46.37%가 증가하였다. Total flavonoid 함량은 ECT 1.54 mg/g (w/w), EFCT 1.73 mg/g (w/w)로 EFCT가 ECT에 비하여 12.34%가 증가하였으며, EFCTL (1.94 mg/g, w/w) 및 EFCTS (1.85 mg/g, w/w)는 ECT에 비하여 각각 25.97% 및 20.13%가 증가하였다. Baek (25)은 *B. licheniformis* 균주로 40°C에서 48시간 발효시킨 청국장의 polyphenol 함량은 발효하기 전에 비하여 38.05%가 증가한

**ABTS 라디칼 소거활성 및 SOD 유사활성 측정**

ABTS 라디칼 소거활성은 수소공여항산화제(hydrogen-donating antioxidants)와 연쇄절단형 항산화제(chain-breaking antioxidants) 모두를 측정할 수 있으며 수용상(aqueous phase)과 유기상(organic phase) 모두에 적용 가능한 측정방법이다(16). SOD는 항산화제 효소로 세포내 활성산소종을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환시키며, 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 peroxidase나 catalase에 의해 물과 산소로 분해된다. SOD 유사물질은 효소는 아니나 저분자 phytochemicals로 SOD와 유사한 역할을 함으로서 superoxide의 산화반응을 억제하여 생체를 보호하는 역할을 한다(27). ECT, EFCT, EFCTL 및 EFCTS의 ABS 라디칼 소거활성 및 SOD 유사활성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. ABS 라디칼 소거활성 및 SOD 유사활성은 모두 농도 증가에 비례하여 활성이 증가 되었으며, 500 mg%에서의 ABS 라디칼 소거능은 균주발효균인 EFCTL (87.93%) 및 EFCTS (90.01%)가 ECT (77.80%) 및 EFCT (47.31%) 에 비하여 유의적으로 높은 활성을 나타내었고 1,000 mg%에

서는 유사하였다. 1,000 mg%에서의 SOD 유사활성은 EFCTL (32.60%) > EFCTS (27.10%) > EFCT (23.30%) > ECT (22.00%) 순으로 EFCTL에서 높은 활성을 나타내었다. 이상의 결과 발효 꾸지뽕열매 추출물의 phenol성 화합물 및 라디칼 소거활성의 증진은 발효 중에 생산된 물질에 기인된 것으로 사료되며 노화억제와 함께 산화적 장애를 방어하는 천연물 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

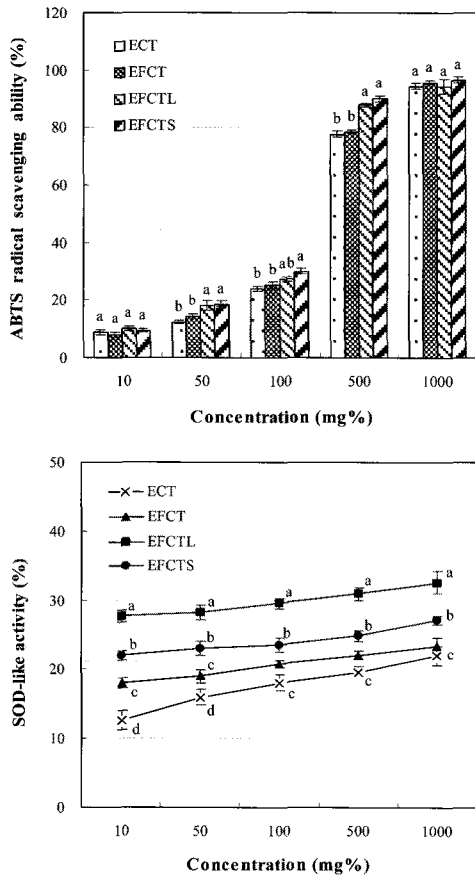


Fig. 1. ABTS radical scavenging ability and superoxide dismutase (SOD) like activity of 70% ethanol extracts of fruit powder from fermented *Cudrania tricuspidata*.

Bars/mean values with different letters are significant differences ( $p < 0.05$ ).

아질산염 소거능 및 ferrous ion chelating 효과 측정 발암에 관련된 물질로 알려진 nitrite 및 nitrite로 전환이 가능한 nitrate는 일정농도 이상 섭취 시 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성한다. 또한 혈액중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 각종 중독을 일으키는 것으로 알려져 있어(28) 아질산염소거능은 항암작용을 간접적으로 알 수 있는 하나의 지표로 이용된다. ECT, EFCT, EFCTL 및 EFCTS의 아질산염 소거능 및 체내에서 세포의 지질 및 단백질의 산화를 촉진하는  $Fe^{2+}$ 의 chelating 효과를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 모두 농도증가에 비례하여 활성이 증가 되었으며, 1,000 mg%에

서의 아질산염 소거능은 EFCTS (51.18%) > EFCTL (45.61%) > EFCT (41.93%) > ECT (27.76%) 순으로 EFCTL 및 EFCTS가 ECT에 비하여 각각 64.30% 및 84.37%가, EFCT에 비하여 각각 22.06% 및 8.78%가 증가하였다. 1,000 mg%에서의 ferrous ion chelating 효과는 EFCTL (67.34%) > EFCTS (60.36%) > ECT (52.34%) > EFCT (51.73%) 순으로 ECT 및 EFCT는 유사한 활성을 나타낸 반면 균주발효균인 EFCTL 및 EFCTS에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며, EFCTL에서 가장 높은 활성을 나타내었다. Takashi 등(29)은 polyphenol 과 flavonoid 화합물은 종류에 따라 차이는 있으나 아질산염을 효과적으로 분해하여 nitrosamine의 생성을 억제한다는 보고하여 본 연구와 일치하였다. 한편 ferrous ion chelating 효과에서 EFCTL이 EFCTS에 비하여 높은 활성을 나타내는 것은 금속이온을 제거할 수 있는 물질과 radical을 제거할 수 물질이 다르기 때문이라 판단된다(30). 따라서 발효 꾸지뽕열매 추출물은 체내에 생성된  $Fe^{2+}$ 를 효과적으로 제거시킬 수 있는 천연물로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

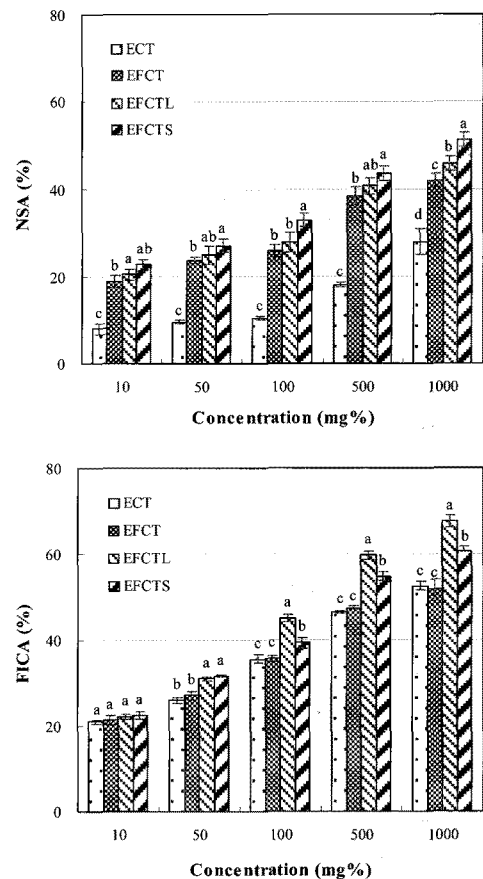


Fig. 2. Nitrite scavenging activity (NSA) and ferrous ion chelating activity (FICA) of 70% ethanol extracts of fruit powder from fermented *Cudrania tricuspidata*.

Bars/mean values with different letters are significant differences ( $p < 0.05$ ).

Xanthine oxidase, elastase 및 tyrosinase 저해 활성 측정

Xanthine oxidase는 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 uric acid를 형성하여 염증 및 심한 통증을 동반하는 통풍과, 신장에 침착 시 신장질환을 유발하는 효소로 알려져 있어 xanthine oxidase의 저해는 활성산소의 생성을 억제하므로 항산화, 노화 및 항암 등 생물학적으로 중요한 효소라고 할 수 있다. Elastase는 진피 내 피부 탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 관여하며, 또한 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 활성이 높아져 조직과괴의 직접적인 원인이 되어 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발한다(31). 따라서 elastase 저해제는 피부의 주름을 개선하는 효과가 있다. 또 tyrosinase는 tyrosine을 DOPA (dihydroxyphenylalanine)로의 전환에 관여할 뿐만 아니라 DOPA를 DOPA-quinone으로 전환시킴으로서 적색의 melanin 색소를 생성하는 중간반응에 관여한다(32). ECT, EFCT, EFCTL 및 EFCTS의 xanthine oxidase, tyrosinase 및 elastase 저해활성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. Xanthine oxidase 저해활성에서는 ECT, EFCT, EFCTL 및 EFCTS가 각각 57.94%, 63.46%, 80.34% 및 86.78%로 EFCT는 ECT에 비하여 9.53%가 증가하였으며 EFCTL 및 EFCTS는 각각 38.66% 및 49.78%가 증가하였다. Elastase 저해활성에는 EFCT (50.12%)가 ECT (40.44%)에 비하여 23.94%가 증가하였다. 반면에 균주발효균 EFCTL (76.49%) 및 EFCTS (72.33%)는 ECT에 비하여 각각 89.14% 및 31.89%가, EFCT에 비하여 각각 52.61% 및 44.31%가 증가하였다. Tyrosinase 저해활성에도 균주발효균 EFCTL (69.32%) 및 EFCTS (66.12%)가 ECT (37.23%)에 비하여 각각 86.19% 및 77.60%가, EFCT (44.65%)에 비하여 각각 55.25% 및 48.09%가 증가되어 발효 처리시 저해활성이 증가하는 것으로 나타났다. Hatano 등(33)은 galloyl기를 함유한 flavonoid 화합물이 xanthine oxidase를 경쟁적으로 저해한다고 하여 본 연구에서 균주 발효균에서 저해활성이 증가한 것은 total polyphenol 및 flavonoid 함량이 증가한 것과 더불어 발효 중에 생산된 물질에 기인된 결과라 사료된다. Cha 등(34)은 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii* 및 *Monascus purpureus* 균주로 발효시킨 발효당귀의 tyrosinase 저해활성은 발효 전에 비하여 약 2배이상 증가한다고 보고하였다. Park 등(35)은 B16BL6 mouse melanoma cell을 이용하여 melanin 생합성 억제율을 측정한 결과 동충하초 균사체로 발효시킨 뽕잎 추출액은 그 활성의 증진은 물론 세포독성 경감, tyrosinase 활성저해 및 melanin 생합성 억제 작용이 증가한다고 보고하였다. 따라서 이는 미생물 또는 균사체로 발효시킬 시

세포독성 경감, tyrosinase 및 elastase 활성을 저해활성이 증진됨을 시사한다. 이상의 결과 발효 꾸지뽕열매 추출물은 다양한 항산화 활성 증대효과를 나타냄으로써 산화적 손상 예방 소재개발에 활용 가치가 있다고 사료되며, 또한 기능성 화장품의 소재로 다양한 분야에서 활용 가치가 있을 것으로 기대된다.

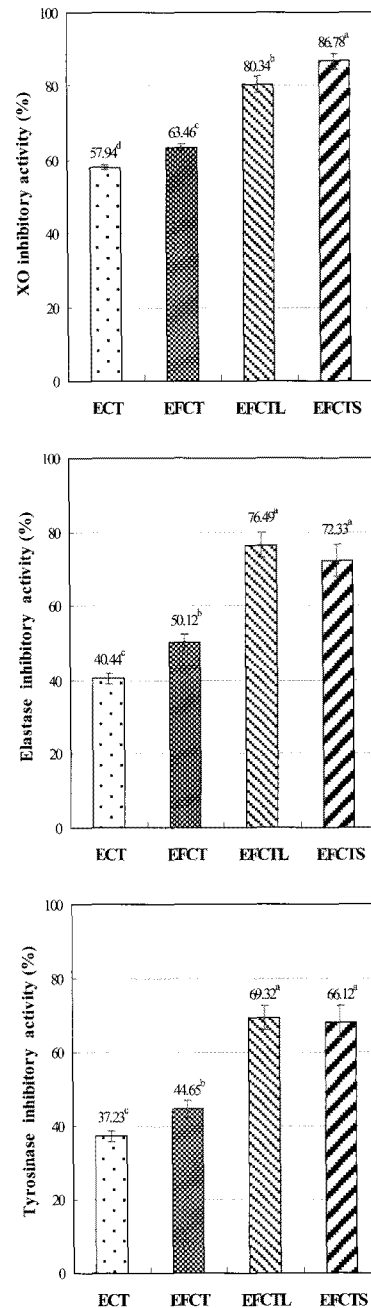


Fig. 3. Xanthine oxidase (XO), elastase and tyrosinase inhibitory activity of 70% ethanol extracts of fruit powder from fermented *Cudrania tricuspidata* (500 mg%, dry basis).

Values are means ± standard deviation of triplicate determinations. Bars/mean values with different letters are significant differences (p<0.05).

## 요 약

발효 꾸지뽕열매의 기능성 소재으로서의 개발 가능성을 알아보고자 70% ethanol 추출물에 대한 항산화 활성과 elastase 및 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 실험군은 꾸지뽕열매 분말 70% ethanol 추출물(ECT), 40℃에서 48시간 발효시킨 분말의 70% ethanol 추출물(FECT), *B. licheniformis* 균주로 40℃에서 48시간 발효시킨 분말의 70% ethanol 추출물(FECTL), *B. subtilis* 균주로 40℃에서 48시간 발효시킨 분말의 70% ethanol 추출물(FECTS) 각각을 동결건조하여 실험에 사용하였다. 수율은 ECT, EFCT, EFCTL 및 EFCTS가 각각 54.22%, 54.43%, 57.71% 및 57.23%로 높은 수율을 나타내었으며, 균주 발효 시 증가하는 경향을 보였다. L\*, a\* 및 b\* 값은 발효 처리구에서 감소하였다. Total polyphenol 함량은 ECT 8.13 mg/g (w/w), EFCT 9.53 mg/g (w/w)로 EFCT가 ECT에 비하여 17.22%가 증가하였고, 균주발효균인 EFCTL (11.03 mg/g, w/w) 및 EFCTS (11.90 mg/g, w/w)는 ECT에 비하여 각각 35.67% 및 46.37%가 증가하였다. Total flavonoid 함량 역시 ECT 1.54 mg/g (w/w), EFCT 1.73 mg/g (w/w)로 EFCT가 ECT에 비하여 12.34%가 증가하였으며, EFCTL (1.94 mg/g, w/w) 및 EFCTS (1.85 mg/g, w/w)는 ECT에 비하여 각각 25.97% 및 20.13%가 증가하였다. ABS 라디칼 소거능은 ECT (94.61%), EFCT (95.85%), EFCTL (94.36%), EFCTS (96.69%)로 유사하였다. SOD 유사활성은 ECT (22.00%), EFCT (23.30%), EFCTL (32.60%), EFCTS (27.10%)로 EFCTL에서 높았으며 아질산염소거능에서도 유사한 경향을 나타내었다. Ferrous ion chelating 효과에서는 EFCTL (67.34%) > EFCTS (60.36%) > ECT (52.34%) > EFCT (51.73%) 순이었다. 발효처리균 EFCT, EFCTL 및 EFCTS는 무처리균 ECT에 비하여 xanthine oxidase 저해활성은 각각 9.53%, 38.66% 및 49.78%가, elastase는 19.93%, 86.19% 및 77.60%가, tyrosinase는 23.94%, 89.14% 및 78.86%가 증가하였으며 균주발효균에서 그 활성이 월등히 증가하였다. 이상의 결과, 발효 꾸지뽕열매 70% 에탄올 추출물은 항산화활성이 우수하여 기능성 증진용 소재 활용에 효과가 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2010년 농림수산식품부 연구개발과제(과제번호 109142-04-2-HD110) 지원에 의한 것으로 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Lee CB (1985) Dehanshikmuldogam, Hyangmoonsha, p 285

2. Ottersen T, Vance B, Doorenbos NJ, Chang BL, El-Feraly FS (1997) The crystal structure of cudranone, 2,6,3'-trihydroxy-4-methoxy-2'-(3-methyl-2-butenyl)-benzophenone: A new antimicrobial agent from *Cudrania chochinensis*. Acta Chem Scand, 31, 434-436
3. Chen F, Nakashima N, Kimura I, Kimura M (1995) Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*folium mori*) and cortex mori radices in streptozotocin-induced diabetic mice. Ykugaku Zasshi, 115, 476-482
4. Cha JY, Kim HJ, Jun BS, Cho YS (2000) Effects of water extract of leaves from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentration of serum and liver in rats. J Korean Soc Agric Chem Biotechnol, 43, 303-308
5. Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh HC, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS (2002) Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in no-dependent hypertension. Life Sci, 70, 2599-2609
6. Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim HM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID (1996) Cytotoxic benzylidihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. Phytochem, 41, 213-216
7. Oh PS, Lee HJ, Lim KT (2009) Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* bureau on histamine release and COX-2 activity in RBL-2H3 cells. Korean J Food Sci Technol, 41, 405-412
8. Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY (2004) Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* jb-1 from Chungkook-jang and fermentation characteristics of jb1. Korean J Microbial Biotechnol, 32, 291-296
9. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH (2001) Antimicrobial activities of viscous substance form *Chongkukjang* fermented with different *Bacillus* spp. J Fdhyg Safety, 16, 188-193
10. Shih IL, Van YT, Chang YN (2002) Application of statistical experimental methods to optimize production of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. Enzyme Microb Technol, 31, 213-220
11. Lee TS, Choi JY (2005) Volatile flavor components in mash of *Takju* prepared by using *Aspergillus kawachii* nuruks. Korean J Food Sci Technol, 37, 944-950
12. Lee MY (2005) Quality and functional characteristics of *chungkukjang* fermented by *Bacillus* sp. isolated from commercial products. MS Thesis, Catholic University, Daegu, p 1-62
13. Seo JH (2007) Modulation of functional properties of poly- $\gamma$ -glutamic acid by chemical modification. PhD

- thesis, Keimyung University, Daegu, Korea
14. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 50, 3010-3014
  15. Saleh ES, Hameed A (2008) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem*, 114, 1271-1277
  16. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237
  17. Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biol Chem*, 47, 468-474
  18. Kato H, Lee I.E, Chuyen NV, Kim SB, Hayase F (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agri Bio Chem*, 51, 1333-1338
  19. Yen GC, Duh PD, Tsai HL (2002) Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and garlic acid. *Food Chem*, 79, 307-313
  20. Stirpe F, Corte Della E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem*, 244, 3855-3863
  21. James AEK, Timothy DW, Gorden L (1996) Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic tyrosinase inhibitors. *Biochem*, 35, 9090-9096
  22. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol*, 27, 891-896
  23. Cha JY, Jeong JJ, Kim YT, Seo WS, Yang HJ, Kim JS, Lee YS (2006) Detection of chemical characteristics in Hamcho (*Salicornia herbacea*) according to harvest periods. *J Life Sci*, 16, 683-690
  24. Kwak EJ, Lim SI (2007) Effect of food additives on inhibiting the browning of model solution for doenjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36, 589-594
  25. Baek LM (2009) Effect of soybean germination on the quality characteristics of Cheongkookjang inoculated with *Bacillus licheniformis* B-59 isolated from rice straw. MS Thesis, Catholic University, Daegu, Korea, P 34
  26. Lee SG, Kim HJ, Lee SP, Lee IS (2009) Antioxidant and anticancer activities of defatted soybean grits fermented by *Bacillus subtilis* NUC1. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38, 657-662
  27. Kitani K, Minami C, Amamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC (2002) Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. *Ann NY Acad Sci*, 959, 295-307
  28. Na GM, Han HS, Ye SH, Kim HK (2004) Physiological activity of medicinal plant extracts. *Kor J Food Preserv*, 11, 388-393
  29. Takashi Y, Yamamoto M, Tamura A (1978) Studies on the formation of nitrosamines; The effects of some polyphenols on nitrosation of diethylamine. *J Food Hyg Soc*, 19, 224-229
  30. Seo SJ, Choi Y, Lee SM, Kong S, Lee J (2008) Antioxidant activities and antioxidant compounds of some specialty rices. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 129-135
  31. DeWitt DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA, Smith WL (1981) Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 256, 10375-10382
  32. Jimenez M, Kameyama K, Maloy WL, Tomita Y, Hearing VJ (1988) Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 3830-3834
  33. Hatano T, Yasuhara T, Yoshihara R, Okuda T (1991) Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Planta Med*, 57, 83-84
  34. Cha JY, Kim HW, Heo JS, Ahn HY, Eom KE (2010) Ingredients analysis and biological activity of fermented *Angelica gigas* Nakai by mold. *J Life Sci*, 20, 1385-1393
  35. Park SS, Ryu YB, Lee YH, Cho YU, Cho SJ, Choi YJ, Park KH, Gal SW (2007) Inhibition of melanin synthesis by mulberry leaf extract. *J Life Sci*, 17, 816-821