

Healthy Functional Food Properties of Phenolic Compounds Isolated from *Ulmus pumila*

Kyung-Bum Kim¹, Bun-Sung Jo¹, Hye-Jin Park², Ki-Tae Park³, Bong-Jeun An⁴, Dong-Hyun Ahn⁵, Myung-Uk Kim⁶, Jung-Woo Chae⁷ and Young-Je Cho^{8*}

¹School of Food science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea,

²School of Applied Bioscience, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea,

³Dept. of Hotel Culinary Arts, Dongju University College, Busan 604-715, Korea,

⁴Department of Cosmeceutical, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, Korea

⁵Dept. of Food Science and Technology/ Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

⁶Gyeongbuk Institute for Marine Bio-Industry, Uljin 767-813, Korea

⁷Gyeonggi-Do Forest Environment Research Institute, Osan 447-290, Korea,

⁸School of Food science & Biotechnology / Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

유근피(*Ulmus pumila*)로부터 분리한 phenolic 물질의 건강기능식품 활성

김경범¹ · 조분성¹ · 박혜진² · 박기태³ · 안봉전⁴ · 안동현⁵ · 김명욱⁶ · 채정우⁷ · 조영제^{8*}

¹경북대학교 식품과학부, ²경북대학교 응용생명과학부, ³동주대학 호텔조리과, ⁴대구한의대학교 화장품약리학과, ⁵부경대학교 식품가공학과, ⁶한국해양바이오연구원, ⁷경기도산림환경연구소, ⁸경북대학교 식품공학부/식품생물산업연구소

Abstract

The phenolic compounds which were extracted with 70% ethanol from *Ulmus pumila* for 12 hr were the highest as 17.9±1.0 mg/g. DPPH scavenging activity of 70% ethanol extracts was also the highest as 89.5±1.9% and it was confirmed to be high as 80% over in both of water and 70% ethanol extracts containing 50 µg/mL over phenolic concentration. ABTS radical cation decolorization activities of water and 70% ethanol extracts were higher as 96.8±2.9%, antioxidant protection factor (PF) was 2.0 PF in 70% ethanol and showed higher activities in both of water and 70% ethanol extracts containing 200 µg/mL phenolic concentration as 2.5 PF than BHA. TBARS of 70% ethanol extracts was 86.5±4.6%, it showed high anti-oxidative activity in 50~200 µg/mL phenolic concentrations of water and 70% ethanol extracts as 80% over. The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Ulmus pumila* extracts against hypertension was 77.4% and 90.6% in water and 70% ethanol extracts of 200 µg/mL phenolic concentration. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Ulmus pumila* extracts for anti-gout effect was not observed in water extracts, but it showed 30% inhibitory activity in 70% ethanol extracts, and 48.1% at 200 µg/mL phenolics concentration.

Key words : Phenolic compounds, *Ulmus pumila*, antioxidant activity, angiotensin converting enzyme inhibition, xanthin oxidase inhibition

서 론

현대적 산업의 발달과 더불어 풍요로운 경제적, 문화적

혜택을 영위하고 있으나, 평균 수명의 연장과 함께 성인성 질환과 고령화 사회에 따른 삶의 질을 높이고자 하는 인식이 고조되고 있다(1). 생체 내에서 에너지 생산을 위한 산화과정 중에 상당량의 유해한 활성산소들이 생성된다. 이들 활성산소는 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸이 되지만

*Corresponding author. E-mail : yjcho@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-7755, Fax : 82-53-950-7762

순간적으로 활성산소가 발생되어 항산화 방어계와의 균형이 깨지면 각종 질환의 원인이 된다(2). 생체효소 및 지방의 변이원성 및 독성으로 인체에 암을 유발 할 수 있는 합성 항산화제에 비해 자연에 존재하는 천연 항산화제들은 인체에 해를 끼치는 독성에서는 비교적 자유로우나 항산화력이 비교적 낮아, 안전하고 효력이 강한 천연 항산화제의 필요성이 대두되었다(3,4). 최근 식물에 존재하는 폴리페놀 화합물은 효소 단백질 같은 거대 분자들과 결합하는 성질에 의하여 항균, 항산화 및 다양한 생리활성 등을 나타낸다(5). 이들 식물체 중에서 생약재료가 가장 많이 연구되고 있는데, 항암활성 및 면역증강 효과, 항산화 효과 등의 약리작용 때문에 건강식품 및 의약품 소재로 널리 이용되고 있다(6).

느릅나무과(*Ulmaceae*)에 속하는 유근피(楡根皮, *Ulmus pumila* L.)는 낙엽교목으로 전국 각지에 야생하며 일본, 중국에 분포하는 것으로, 느릅나무(*Ulmus davidianavar. japonica* Nakai)의 껍질을 건조한 것으로 유백피라고도 한다(7). 한방에서 유근피는 맛이 달고, 무독하며, 중창, 관절염, 위궤양, 위장병 등에 사용되고, 거담, 항암, 상처치료약 및 염증에도 탁월한 효과가 있다고 보고되어 있으며(8), 우리나라에서도 풍부하게 생산되고 있다. 또한 느릅나무 과실은 구충작용, 항진균작용이 있다고 보고되어 있으나(9), 유근피의 다양한 생리활성을 연구한 시도는 아직까지 다양하게 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 한국산 약용식물인 유근피로부터 페놀성 물질을 분리하여 생체 내 생리활성 효과에 대한 기초자료를 얻고자 *in vitro*에 의한 전자공여능과 지질과산화 억제효과 등의 항산화 활성과 고혈압 예방 효과, 통풍 억제 효과, 항당뇨효과 및 항염증효과 등의 약리성 식품생리활성을 탐색하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용한 유근피(*Ulmus pumila* L.)는 시중 한약상에서 구입하여 40 mesh로 분쇄하여 4°C에서 저온저장하며 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

시료 추출은 물(열수)추출물의 경우 건조 유근피 1 g에 증류수 200 mL를 가하고 액이 100 mL가 될 때 까지 가열한 후 냉각하고 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 시료 1mL에 100 mL의 각 농도(10~100%)별 ethanol을 가하여 24시간 동안 상온 교반 추출하였으며, 추출액은 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 45°C의 water bath상에서 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)를 이용하여 농축한 후 시료로 사용하였다. 농축된 시료액은

phenolics 농도를 측정하여 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics로 농도를 맞춘 후 생리활성 실험에 사용하였다.

Total phenolic compound 정량

총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법(10)으로 측정하였으며, 시료액 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어 주고, 5분간 방치한 후, 5% Na₂CO₃ 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

Electron donation ability 측정

DPPH (α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl) radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법(11)에 준하여 측정하였다. 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics 농도를 가지는 각 시료 0.5 mL에 60 µM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음의 식으로 나타내었다.

$$\text{Electron donation ability (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of control}}{\text{Absorbance of sample}}\right) \times 100$$

ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical cation decolorization의 측정은 Pellegrin 등의 방법(12)으로 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 5 mL과 140 mM K₂S₂O₈ 88 µL를 섞어 어두운 곳에 16시간 정도 방치한 용액 1 mL와 ethanol 88 mL를 혼합한 ABTS solution 1 mL를 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics 농도를 가지는 시료용액 50 µL와 혼합하여 30초간 진탕한 후 2분 30초간 incubation하고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 효과는 percentage inhibition(%)으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of control}}{\text{Absorbance of sample}}\right) \times 100$$

Antioxidant protection factor(PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법(13)으로 측정하였다. 10 mg의 β-carotene/50 mL chloroform 용액 1 mL를 evaporator용 수기에 넣고 40°C water bath에서 chloroform을 증류시킨 후, 20 µL linoleic acid, 184 µL Tween 40과 50 mL H₂O₂를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion을 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics 농도를 가지는 시료용액 100 µL에 혼합하여 잘 섞어준 뒤 50°C에서 30분간 반응시켜 냉각시킨 다음, 470 nm에서 흡광도를 측정하였고 PF는 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Antioxidant protection factor (PF)} = \frac{\text{Absorbance of control}}{\text{Absorbance of sample}}$$

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정

TBARS는 Burge와 Aust의 방법(14)에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics 농도를 가지는 시료 0.2 mL를 섞은 후 50°C water bath에서 10시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA/TCA 시약 3 mL를 가하고 15분간 boiling한 다음 10분간 냉각시킨 후 15분간 1000 rpm으로 원심분리하여 실온에서 10분간 방치 후 상정액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS값은 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 µg으로 계산한 후 percentage inhibition(%)으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{1,1,3,3-tetraethoxypropane (\mu g) of control}}{\text{1,1,3,3-tetraethoxypropane (\mu g) of sample}}\right) \times 100$$

항고혈압(Angiotensin converting enzyme [ACE] 저해) 효과 측정

ACE 저해효과 측정은 Cushman 등의 방법(15)으로 행하였다. 즉, 반응구는 0.3 M NaCl을 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8.3)에 기질인 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL, Sigma, USA) 2.5 mM을 녹인 액 0.15 mL와 ACE (0.25 unit/mL, Sigma, USA) 0.1 mL와 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics 농도를 가지는 각 시료 용액 0.1 mL를 혼합하였으며, 대조구는 추출시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고, 1 N HCl 0.25 mL 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3 mL의 ethyl acetate를 첨가하였다. Ethyl acetate층만을 분리한 후 ethyl acetate층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 2 mL의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 spectrophotometer를 사용하여 흡광도 280 nm에서 측정하고, hippuric acid를 사용한 표준곡선으로 환산, 정량한 후 다음 식에 따라 percentage inhibition(%)을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Content of hippuric acid in sample}}{\text{Content of hippuric acid in control}}\right) \times 100$$

항관절염(Xanthin oxidase(XOase) 저해) 효과 측정

XOase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte의 방법(16)에 준하여 측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 xanthine 2 mM을 녹인 기질액 3 mL에

효소액 0.1 mL와 50, 100, 150, 200 µg/g의 phenolics 농도를 가지는 각 시료용액 0.3 mL를 넣고 대조구에는 추출용액 대신 증류수를 0.3 mL 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid (TCA) 1 mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여, uric acid를 사용한 표준곡선으로 환산, 정량한 후 다음 식으로 percentage inhibition(%)을 구하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Content of uric acid in sample}}{\text{Content of uric acid in control}}\right) \times 100$$

Helicobacter pylori 항균 활성 측정

실험에 사용한 균주는 위, 십이지장궤양 원인균인 *Helicobacter pylori*로서 표준균주인 ATCC 43504를 사용하였고, *H. pylori*의 배양에는 최적배지(special pepton 0.5 g, agar 0.75 g, NaCl 0.25 g, yeast extract 0.25 g, beef extract 0.2 g 및 pyruvic acid 0.025 g)를 사용하였으며 *H. pylori* 배양은 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO₂ incubator를 이용하였고, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였으며, agar plate상에서 배양은 37°C로 48~72시간 동안 실시하였다(17). Disc method에 의한 항균활성 검사는 최적배지 agar plate에 준비한 균 배양액 100 µL를 분주하여 멸균 유리병으로 도말한 다음, 멸균된 지름 8 mm 크기의 disc paper를 올려놓고 0.45 µm membrane filter로 제균한 시료용액 100 µL에 phenolics 농도가 50 µg/100 µL, 100 µg/100 µL, 150 µg/100 µL 및 200 µg/100 µL가 되도록 각각 분주하였다. 대조구로는 멸균수 100 µL를 흡수시켜 24시간 동안 배양하여, disc 주위의 clear zone 생성 유무(18)와 직경을 측정함으로써 항균활성을 계산하였다.

항염증(Hyaluronidase [HAase]억제) 효과 측정

HAase 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid (HA)로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucoxazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylamino benzaldehyde (DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다(19). Hyaluronidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

유근피 추출물을 이용한 tablet 제조

Tablet의 제조는 유근피 추출물을 농축하여 70° brix가 되도록 진공 농축기를 이용하여 농축하고 동결건조기로 분말을 제조한 후 혼합기를 이용하여 Table 1과 같이 부재

료와 완전히 혼합이 되도록 한 다음 tablet 제조기에 원료를 투입하여 사출되어 나오는 tablet을 하루 동안 건조시켜 포장하였다.

Table 1. Recipe of mixing ratio of *Ulmus pumila* L. tablet

Ingredients	Content (%)
D-sorbitol	34.34
Extracted powder of <i>Ulmus pumila</i> L.	12.0
HPMC	2.0
Milk aroma powder	0.5
Strawberry aroma powder	3.5
Plant cream powder	2.0
Magnesium Stearic acid powder	3.0
Beef red powder	0.75
Aspartame	0.41
Fructooligo saccharide	5.0
Vitamin E powder	0.125
Vitamin D3 powder	0.125
Vitamin B1 hydrochloride powder	0.25
Total	100.0

제조한 Tablet의 관능 평가

Tablet을 제조한 후에 백색 사기 용기에 sample을 4 개씩 담아서 준비하고, 반드시 한 시료의 관능평가가 끝나면 물로 입안을 행구어 뱉을 수 있도록 20℃의 물과 종이컵을 제공하였다. 평가 내용은 색(color), 풍미(flavor), 맛(taste), 전반적인 기호도(overall acceptability)등을 9점 척도법으로 평가하였으며, 아주 나쁜 것은 1점, 보통은 5점, 아주 좋은 것은 9점으로 점수화 하였다.

결과 및 고찰

Phenolic 물질의 추출 조건

식물계에 널리 분포되어 있는 phenolic compounds는 식물의 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 단백질 등의 거대 분자들과 결합하는 성질이 있어 항산화, 항균활성 등과 같은 여러 생리 기능을 가진다고 보고되어 있다 (20). 따라서 유근피로부터 phenolic compounds를 추출하기 위하여 추출용매를 달리하여 phenolic compounds의 용출량을 알아보았다. 그 결과 Fig. 1. A와 같이 methanol을 이용하여 추출 하였을 때 phenolic compounds가 가장 많이 용출되는 것을 알 수 있었으며, 물과 ethanol을 용매로 하였을 경우에는 용출량이 각각 16.1±0.2 mg/g과 15.9±0.3 mg/g으로 methanol을 용매로 하였을 때의 16.8±0.1 mg/g 보다는 적으

나 acetone을 용매로 사용하였을 때의 15.2±0.1 mg/g으로 보다는 높게 나타났다. 유근피의 경우 메탄올을 용매로 추출하는 것이 가장 높게 나타나 유근피의 phenolic compounds가 극성용매에서 용해도가 높은 것으로 확인되어 유기용매에서 phenolic compounds의 추출수율이 높다는 신의 결과(21)와 유사하였으나, 메탄올 추출물은 식품에 적용시킬 수가 없어 비교적 추출수율이 높은 물과 ethanol 추출물에 대하여 연구를 진행하였다. 유근피 추출물의 추

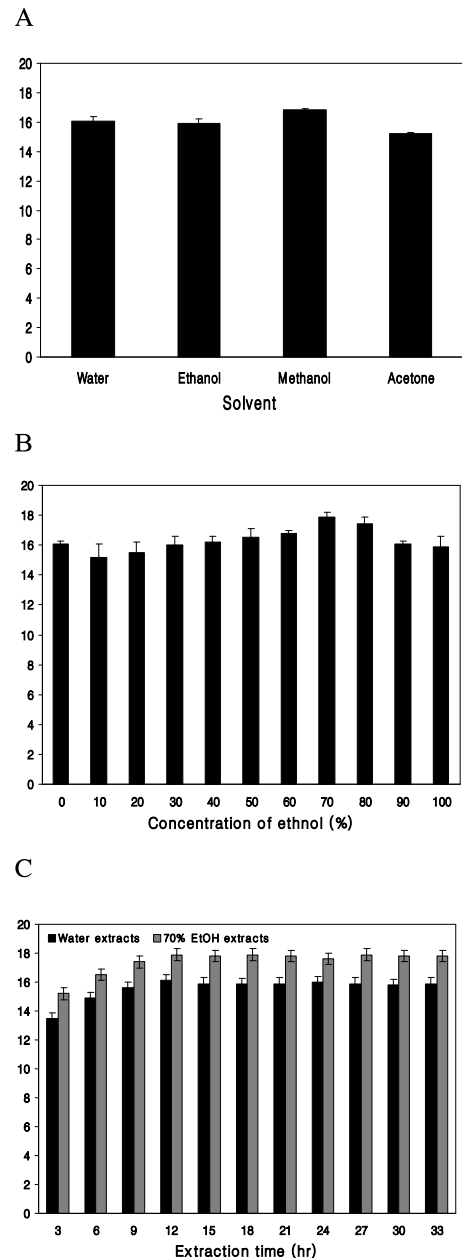


Fig. 1. The optimum condition for extraction of phenolics from *Ulmus pumila*.

The data were expressed as the mean±SD (n=3), Contents of phenolics were expressed as mg/g of gallic acid, A: various solvents, B: Concentration of extraction solvent, C: extraction time.

출 조건을 확립하기 위하여 다양한 농도(10~100%)의 ethanol을 추출용매로 하여 phenolic compounds의 용출량을 측정된 결과 Fig. 1. B와 같이 유근피로부터 물 추출물의 phenolic compounds 함량보다 70% ethanol 추출물의 함량이 높았으며, 70% ethanol 추출물이 17.9±0.3 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 이는 ethanol 농도에 따라 용출되어 나오는 phenol성 물질의 종류가 다르기 때문인 것으로 판단되었으며, 농도별 차이는 크지 않았다. 유근피 추출물을 식품 및 화장품에 적용하고자 추출 용매를 물과 인체에 유해하지 않으며 phenol성 물질의 용해도가 높은 물과 70% ethanol을 이용하여 33시간동안 3시간 간격으로 phenol성 물질의 용출량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1. C와 같이 물 추출물과 ethanol 추출물 모두 3시간까지 용출량이 급격히 증가 하였으며, 물과 70% ethanol 추출물 모두 6시간에서 12 시간까지 phenol성 물질의 함량이 16.1 mg/g과 17.9 mg/g으로 용출량이 서서히 증가하다가 12시간 이후 용출량의 변화가 거의 없음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 분석한 결과 물 추출물보다 70% ethanol 추출물이 높은 용출량을 나타내었고 12시간 추출하였을 때 용출량이 가장 높은 것으로 나타나 생리기능성 탐색을 위하여 유근피를 물과 70% ethanol을 이용하여 12시간 추출 한 후 시료로 사용하기로 하였다.

유근피 추출물의 항산화 효과

전자공여능 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 자신이 가지고 있는 흡수 스펙트럼을 보이나, phenolics와 같이 수소에 전자를 제공해 주는 전자공여체와 반응하게 되면 전자 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 되며, 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔이 점점 옅어지게 되므로 항산화 효과를 검증하는데 이용되고 있다(22).

유근피추출물의 전자공여능을 측정된 결과 Fig. 2-A와 같이 150 µg/mL의 phenolics 농도의 물 추출물의 경우 95.6%로 최대 효과를 나타내었고, 70% ethanol 추출물의 경우 phenolic의 첨가 농도가 높아질수록 전자공여능은 증가하는 양상을 나타내어 농도의존적인 양상을 나타내는 것을 확인하였다. 첨가 농도 간 격차는 크지 않았으나, 150 µg/mL의 phenolics 농도의 물 추출물과 70% ethanol 추출물 모두에서 80% 이상의 높은 전자공여능이 확인되어 유근피 추출물의 경우 저 농도에서도 항산화 효과가 매우 우수한 것으로 확인 되었다. 또한 positive control인 BHA에 비해서도 더욱 우수한 항산화력을 나타내어 산업적으로 활용이 가능 할 것이라 판단되었다. 추출물들의 상대적인 항산화 측정은 hydrogen-donating antioxidant와 chain breacking antioxidant 모두를 측정할 수 있으며, aqueous phase와 organic phase 모두에 적용이 가능할 뿐만 아니라, 표준물질

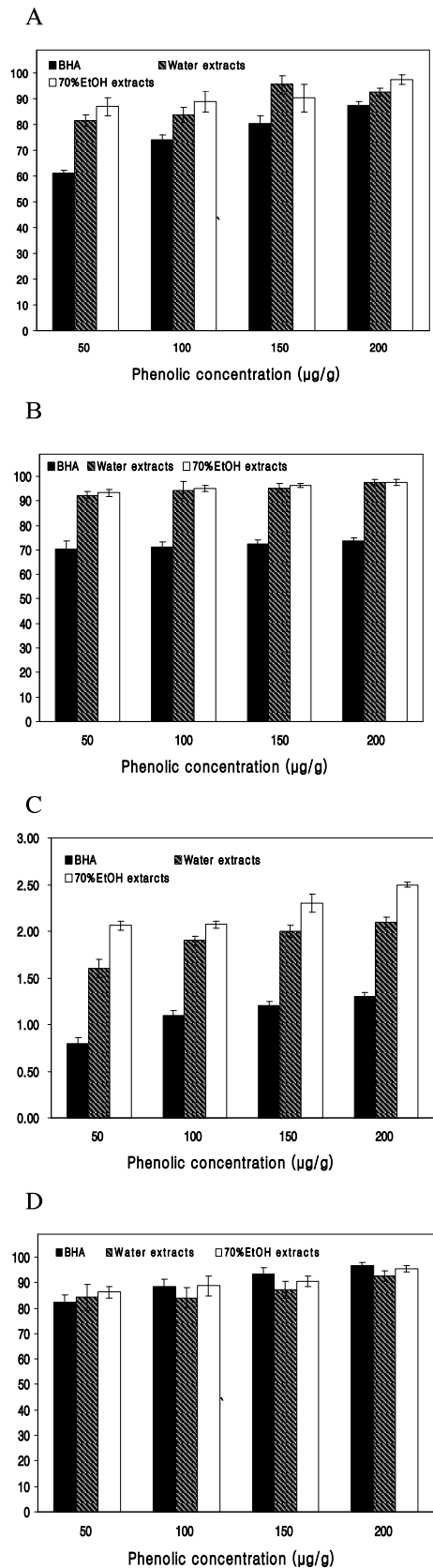


Fig. 2. Anti-oxidative activities of the extracts from *Ulmus pumila*.

The data were expressed as the mean±SD (n=3). A: DPPH, B: ABTS, C: PF, D: TBARS

의 사용으로 추출물의 상대 비교가 가능하도록 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS+ free radical이 추출물속의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 측정하였다(12). 그 결과 Fig. 2-B와 같이 유근피는 200 µg/mL phenolics의 농도에서 positive control인 BHA의 73.5%에 비해서 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 50~200 µg/mL phenolics의 농도에서 모두 92% 이상으로 대조구에 비해 높은 항산화력을 나타내었다. 첨가되는 추출물의 phenolics의 농도를 50~200 µg/mL로 높이면서 antioxidant protection factor의 차이를 측정한 결과 Fig. 2-C와 같이 유근피 에탄올 추출물이 물 추출물보다 상대적으로 높은 PF값을 나타내었으며, positive control인 BHA의 0.8~1.3 PF에 비해서 50~200 µg/mL의 phenolics 농도의 물 추출물과 에탄올 추출물에서 BHA 보다 높은 1.6~2.5 PF의 높은 항산화력을 나타내었고, 첨가되는 phenolic compound의 농도 증가에 따라 PF의 효과도 증가되는 것으로 확인되어 추출물에 대해서 농도 의존적으로 항산화 효과가 나타난다는 것을 확인할 수 있었다. PF의 경우 일반적으로 1.2 PF를 기준으로 그 이상의 경우 지용성 물질에 대한 항산화력이 높다고 판단할 수 있는데, 본 연구에 사용된 유근피의 경우 지용성 물질에 대한 항산화력이 매우 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 산화과정에서 생성되는 지질과산화물인 malondialdehyde의 함량을 측정하였다. 첨가한 phenolic compound의 농도별 항산화력을 측정한 결과 Fig. 2-D와 같이 positive control인 BHA와 대등한 항산화력을 나타내었으며, 첨가되는 phenolic compound의 농도가 높아질수록 항산화력이 다소 높아지는 것이 관찰되었으나 그 차이는 크지 않았다. 따라서 유근피 추출물은 50 µg/mL 농도의 phenolics 첨가라도 84.2%의 높은 항산화 효과를 나타내어 지용성 물질에 대한 항산화 효과는 충분히 기대할 수 있을 것으로 판단되었다. 이상의 결과로 전자공여능과 ABTS 억제제의 우수성과 PF의 항산화 결과 및 TBARS의 항산화 결과를 보아 유근피 추출물의 항산화 효과는 수용성 및 지용성 물질 모두에 대하여 매우 우수한 항산화 자원인 것으로 판단되었다.

항고혈압(Angiotensin converting enzyme 저해) 효과 측정 결과

고혈압은 우리나라에서 암 다음으로 많이 발생하는 대표적인 질환의 하나로 그 원인은 renin-angiotensin계가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 여겨지고 있으며 여기에는 angiotensin converting enzyme (ACE)이라는 효소가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(23). 생체 중에 존재하는 불활성형의 angiotensin I은 ACE에 의해 dipeptide가 떨어져 나감으로써 혈관벽 수축작용이 있는 angiotensin II로 전환된다. 이 물질은 강력한 혈관수축작용을 가지고 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하며, 또한

혈관이완작용을 갖는 bradykinin을 불활성화 시켜 혈압을 상승시키는 역할을 한다(23). 본 연구에서 유근피 추출물의 ACE 저해활성을 측정한 결과 Fig. 3-A, B와 같이 물 추출물에서 약 50%의 저해 활성을 나타내었고, ethanol 농도별 처리에서는 70% ethanol 추출물에서는 58.5±3.1%로 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 50~200 µg/mL의 phenolics 농도의 추출물을 처리 하였을 때 200 µg/mL phenolics의 처리 농도에서 positive control인 captopril이 62.4%인데 비하여 물 추출물의 경우 77.4%±3.1이고, 70% ethanol 추출물에서는 90.6±2.1%의 저해활성을 나타내어 우수한 항고혈압 활성을 나타내었다. 일반적으로 phenol 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 단백질의 아미드 결합과 페놀성 수산기 간의 수소결합에 의한 반응으로 단백질과 복합체의 침전물을 형성한다. 이런 현상은 pH, 이온강도, 단백질 및 phenol 농도에 의한 상호작용으로 비경쟁적 효소를 저해함으로써 효소의 용해성 및 안정성을 저하, 효소 불활성화를 일으키는 것으로 보고(24)되고 있으며, ACE 저해작용을 갖는 nonapeptide인 tetrotide가 고 renin증 환자에서 뿐만 아니라 정상인에서도 현저한 혈압강하 작용을 가지며, ACE억제제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시된 후 이에

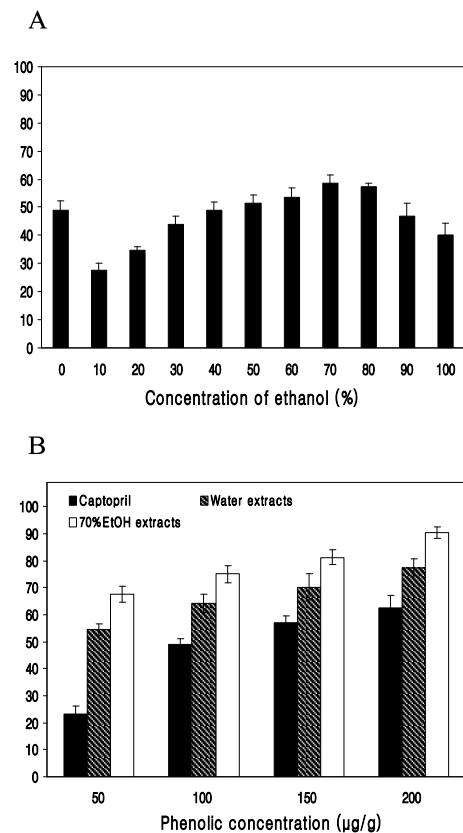


Fig. 3. The effect inhibition on angiotensin converting enzyme of ethanol extracts from *Ulmus pumila*.

The data were expressed as the mean±SD (n=3). A: concentration of ethanol, B: concentration of phenolics.

대한 연구(23-25)가 있었다. 본 연구에서도 유근피 추출물의 ACE 저해활성이 매우 높게 나타나 고혈압 억제에 위한 기능성 소재로의 활용 가능성을 나타내었다.

항관절염(Xanthin oxidase 저해) 효과 측정 결과

Xanthine oxidase(Xoase)는 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하여 urate가 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍(gout)과 신장에 침착되어 신장질환을 일으키는 효소로 알려져 왔다(26). Xanthin oxidase는 분자상의 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매하는 작용을 하므로 xanthin oxidase의 저해 효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다고 할 수 있다. 유근피 추출물의 xanthin oxidase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 4-A, B와 같이 물 추출물에서는 억제 효과를 거의 관찰 할 수 없었고, 40%~80% ethanol 용출용매 농도에서 약 20~30%의 억제효과가 관찰되었다. 또한 70% ethanol을 용매로 사용하였을 때 30%로 최대 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4-A). 50~200 µg/mL의 phenolics 농도의 유근피 추출물을 처리하였을 때 Fig. 4-B에서와 같이 200 µg/mL의 phenolics 처리 농도에서 현재 시중에 통풍 치료약으로 사용되고 있는 positive

control인 allopurinol의 52.7±5.1%의 억제효과와 비슷한 수준인 48.1±1.7%의 억제력을 나타내어 통풍 치료제로서 활용이 가능할 것으로 판단되었다. 물 추출물에 비해 70% ethanol 추출물이 비교적 XOase 저해 활성이 높게 나타난 것은 추출물 속에 함유되어 있는 생리활성 성분이 가지는 phenolic compound의 종류별 차이에 의한 것으로 추측하였다.

Helicobacter pylori 항균 활성 측정 결과

지구상에 존재하는 천연물에는 많은 종류의 항균활성을 가진 생리활성 물질이 존재하는데, 이는 매우 적은 양으로도 고부가가치를 얻을 수 있는 물질로서 오래전부터 이에 대한 연구가 이루어져 이미 수많은 종류가 산업적으로 유용하게 활용되고 있다. *Helicobacter pylori*는 1983년 Warren과 Marshall이 환자의 위유문부로부터 분리하여 보고한 이후 *H. pylori*는 만성 전정부위염과 소화성 궤양의 가장 중요한 요인으로 밝혀져, 십이지장 궤양이나 위궤양 환자에서는 *H. pylori* 억제가 궤양 치료의 필수적 요건이 되어 많은 연구가 이루어졌다(27). *H. pylori*는 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 유병률이 높으며, 다른 내장기관에 영향을 줌으로써 위장관 이외의 질환과도 관련이 있다고 알려져 있다(28). 이러한 만성 위염, 소화성 궤양, 위선암에 관여하는 *H. pylori*군에 대한 유근피 추출물의 항균활성을 측정한 결과 Table 2와 같이 유근피 물 추출물의 경우 *H. pylori*에 대한 항균효과는 거의 없는 것으로 확인 되었다.

항염증(Hyaluronidase 저해) 효과 측정 결과

염증은 외부자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등을 인식하면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다. 고분자 다당인 hyaluronic acid (HA)는 진피층의 섬유아세포로부터 산출되어, 표피 및 진피에 있어서 주요한 세포외 매트릭스로서 glucuronic acid와 glucosamine이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide이다. 또한 HA은 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 한편, HA 분해산물 혹은 저분자 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 이는 결국 고분자 HA의 분해효소인 HAase의 저해에 의해 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로서 항염증 효과를 기대할 수 있다(29). 따라서 염증억제 효과를 확인하기 위하여 유근피 추출물의 hyaluronidase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 5-A와 같이 물 추출물과 ethanol 추출물에서 70% 이상의 높은 저해 양상을 나타내었으며, 50~200 µg/mL phenolics 농도의 70% ethanol 추출물을 처리 하였을

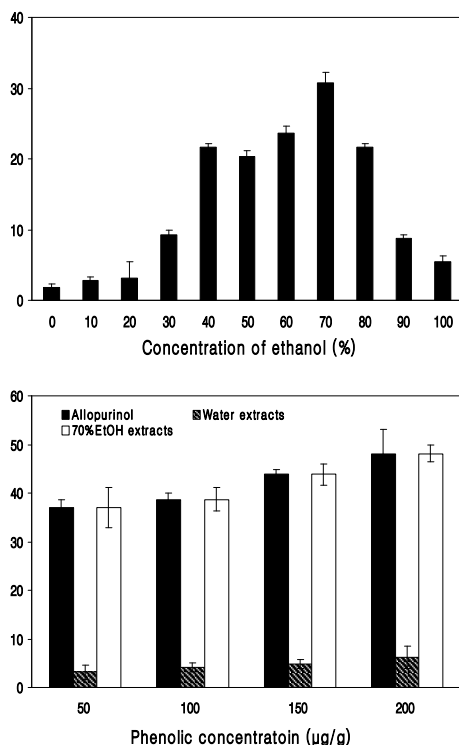


Fig. 4. The effect inhibition on xanthine oxidase of ethanol extracts from *Ulmus pumila*.

The data were expressed as the mean±SD (n=3), A: concentration of ethanol, B: concentration of phenolics.

Table 2. Antimicrobial activity of *Ulmus pumila* water and ethanol extracts

<i>Ulmus pumila</i> extracts	Clear zone (mm)									
	Phenolics contents (µg/100 µL)									
	Water extracts					70% Ethanol extracts				
	0 ¹⁾	50 ²⁾	100 ³⁾	150 ⁴⁾	200 ⁵⁾	0 ¹⁾	50 ²⁾	100 ³⁾	150 ⁴⁾	200 ⁵⁾
<i>H. pylori</i>	- ⁶⁾	-	-	-	-	-	-	-	trace	trace

¹⁾Phenolic concentration of 0 µg/100 µL, ²⁾Phenolic concentration of 50 µg/100 µL,
³⁾Phenolic concentration of 100 µg/100 µL, ⁴⁾Phenolic concentration of 150 µg/100 µL,
⁵⁾Phenolic concentration of 200 µg/100 µL, ⁶⁾Not detected

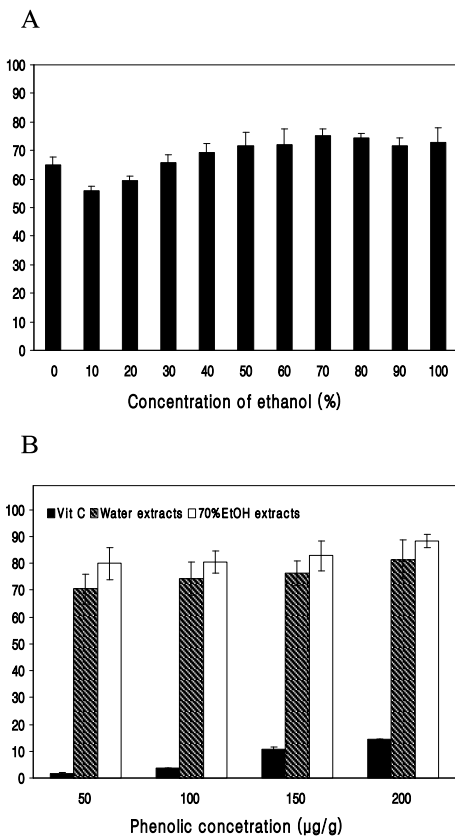


Fig. 5. The effect inhibition on hyaluronidase inhibition of ethanol extracts from *Ulmus pumila*.

The data were expressed as the mean±SD (n=3), A: concentration of ethanol, B: concentration of phenolics.

때 Fig. 5-B와 같이 positive control로 사용한 vitamin C에 비하여 상대적으로 유근피 추출물의 hyaluronidase 억제효과가 대단히 높게 측정되었으며, 50 µg/mL phenolics의 매우 낮은 농도에서도 80%의 항염증효과를 나타내어, 유근피 추출물을 항염증 효과나 아토피 억제효과를 활용하는 제품에 적용할 수 있을 것이라 판단하였다.

유근피 추출물을 이용한 Tablet의 제조 및 관능평가 결과

이상의 생리활성 효과 측정 결과를 바탕으로 기능성 식품으로의 활용을 위한 방안으로 유근피 추출물을 활용하여

Tablet을 개발하여 개발된 제품의 관능평가를 실시하였다. 그 결과 Table 3에서와 같이 유근피 농축액이 함유된 Tablet의 경우 색깔의 관능평점이 8.3로 높게 평가되었고, 맛과 향은 8.8과 8.6의 매우 높은 관능평가 점수를 획득하였으며, 전체적인 기호도 역시 8.7점으로 높은 평가를 받았다.

Table 3. Sensory evaluation of tablet with *Ulmus pumila* extracts

Sample	Color	Taste	Flavor	Overall acceptability
<i>Ulmus pumila</i> extracts tablet	8.3±1.5	8.8±1.2	8.6±2.3	8.7±1.2

The data were expressed as the mean±SD (n=3).

요 약

유근피에 함유된 페놀성 물질은 70% ethanol을 용매로 하여 12시간 추출하였을 때 17.9±1.0 mg/g으로 가장 많이 용출되었다. 유근피 추출물의 항산화력을 측정한 결과 전자공여능은 50 µg/mL 이상의 phenolic 농도에서 물추출물과 70% ethanol 추출물 모두에서 80% 이상의 높은 전자공여능이 확인되었다. ABTS radical cation decolorization을 측정한 결과 유근피는 물과 70% ethanol 추출물에서 96.8±2.9%의 높은 항산화활성이 측정되었으며, antioxidant protection factor 측정에서는 물추출물과 에탄올 추출물 모두 200 µg/mL의 phenolic 농도에서 BHA 보다 높은 2.5 PF의 높은 항산화력이 확인되었다. 유근피 추출물의 thiobarbituric acid reactive substance를 측정한 결과 물 추출물과 에탄올 추출물 전 농도에서 약 80%의 높은 항산화 효과를 나타내었다. 유근피 추출물의 항고혈압 효과를 살펴보기 위하여 angiotensin converting enzyme 저해활성을 측정한 결과 물 추출물에서 약 50%, 70% ethanol 추출물에서 58.5%의 저해활성을 나타내었으며, 200 µg/mL phenolics의 처리농도에서 물 추출물이 77.4%, 70% ethanol 추출물에서 90.6%의 저해활성을 나타내었다. 유근피 추출물의 항관절염 효과를 살펴보기 위하여 xanthin oxidase 저해 활성을 측정한 결과 물 추출물에서는 억제 효과를 관찰할 수 없었고, 70%

ethanol 추출물에서 30%의 억제효과를 나타내었으며, 200 µg/mL phenolics의 처리 농도에서 48.1%의 억제력을 나타내었다. 유근피 추출물의 염증 억제효과를 측정하기 위하여 hyaluronidase 저해활성을 확인한 결과 물 추출물과 ethanol 추출물에서 70% 이상의 높은 저해 양상을 나타내었으며, 50 µg/mL phenolics의 낮은 농도로 처리하였을 경우에도 80%의 항염증효과를 나타내었고, 처리한 phenolic compound의 농도가 높아질수록 억제효과가 높아져 농도의존적인 양상을 나타내었다. 기능성 식품으로의 활용을 위한 방안으로 유근피 추출물을 함유한 tablet(정제)를 개발하고, 개발된 제품의 관능평가를 실시한 결과 색깔의 관능평점이 8.3으로 평가되었고, 맛과 향은 8.8과 8.6의 높은 관능평가 점수를 획득하였으며, 전체적인 기호도 역시 8.7점으로 높은 평가를 받았다.

참고문헌

- Kim JP, Chin II, Cho HK, Ham IH, Whang WK (2004) The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. Korean J Pharmacogn, 35, 98-103
- Aruoma OI (1998) Free radical, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. J Am Oil Chem Soc, 75, 199-212
- Branen AL (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J Am Oil Chem Soc, 52, 59-63
- Choe SY, Yang KH (1982) Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). Korean J Food Sci Technol, 12, 283-288
- Azuma K, Nakayama M, Koshika M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, Yamauchi Y, Ito H, Higashio H (1999) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. J Agric Food Chem, 47, 3963-3966
- Kim SR, Park KM (2003) Physiological activities of *Phellinus riis* extracts. Korean J Food Sci Technol, 35, 690-695
- Chi HJ, Lee SI (1988) Korea pharmacopoeia Herb medicine standard (Herb medicine). Korea medi indekseuse, p 295
- Duke, J. A. 1985. Handbook of medicinal herbs, CRC press, Boca Raton, p.495
- Kim CM, Shin MG, Ann DK, Lee KS (1997) The encyclopedia of oriental herbal medicine. Publication Jungdam, p 3348-3350
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem, 12, 239-249
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200
- Pellegrin N, Roberta R, Min Y, Catherine RE (1998) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. Method in Enzymology, 299, 379-389
- Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Ahrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). J Agric Food Chem, 47, 1776-1780
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Method in enzymol, 105, 302-310
- Cushman DW, Cheung HS (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol, 20, 1637-1648
- Stirpe F, Corte ED (1969) The regulation of rat liver xanthin oxidase. J Biol Chem, 244, 3855-3861
- Gavidson PH, Parish ME (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. J Food Technol, 43, 148-154
- Stevenson TH, Lucia LM, Acuff GR (2000) Development of selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. Appl Environ Microbiol, 66, 723-727
- Choi SI, Lee YM, Heo TR (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts. Korean J Biotech Bioeng, 18, 282-288
- Choi HS, Kim MG, Shin JJ, Pack JM, Lee JS (2003) The antioxidant activities of the some commercial teas. J Korean Soc Food Sci Nutr, 32, 723-727
- Shin HL (2003) Biological activity of phenol compound from muberry fruits. Sangju National University, Food Engineering, MS Thesis
- Aoshima H, Tsumoue H, Koda H, Kiso Y (2004) Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. J Agric Food Chem, 52, 5240-5244
- Miyoshi D, Richard LS (1975) Pulmonary angiotensin converting enzyme. J Biol Chem, 250, 6762-6768
- Funayama S, Hikono H (1979) Hypotensive principles

- of *Diospyros kaki* Leaves. Chem Pharm Bull, 27, 2865-2871
25. Stewart JM, Ferreira SH, Greene LJ (1971) Bradykinin potentiating peptide Pca-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitors of the pulmonary in activation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. Biochem Pharmacol, 20, 157-161
26. Noro T, Fukushima S (1988) Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, Chem Pharm Bull, 31, 3984-3988
27. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, MacConnell W, Harper WES (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter gen. nov.* as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. Int J Syst Bacteriol, 39, 397-402
28. Konturek SJ, Konturek PC, Pieniazek P, Bielanski W (1999) Role of *Helicobacter pylori* infection in extragastrointestinal disorders: introductions remarks. J Physiol Pharmacol, 50, 94-683
29. Ghosh P (1994) The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. Clin Exp Rheumatol, 12, 75-82
-
- (접수 2012년 7월 20일 수정 2012년 10월 5일 채택 2012년 11월 23일)