

추출방법에 따른 상지 추출물의 항산화 활성

박혜미 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Effect of Extraction Methods on Antioxidant Activities of *Mori ramulus*

Hye-Mi Park and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu

ABSTRACT The objective of this study was to examine the antioxidant activities of extracts from *Mori ramulus* using different extraction methods (HE, hot water extraction; EE, 50% ethanol extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction). The extraction yield of PE (3.07%) was higher than that of UE (1.43%), EE (1.18%), and HE (1.07%). The total phenolic and flavonoid contents of EE were 334.66 mg/g, and 35.64 mg/g, respectively. The oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of EE (3,483.37 $\mu\text{M/g FW}$) was higher than those of HE (2,687.52 $\mu\text{M/g FW}$), UE (2,300.45 $\mu\text{M/g FW}$), and PE (2,117.62 $\mu\text{M/g FW}$). The DPPH and ABTS radical scavenging activities of EE at 1,000 $\mu\text{g/mL}$ were 65.84%, and 97.52%, respectively. The superoxide radical scavenging activity of EE was 67.77~98.74% (100~500 $\mu\text{g/mL}$) higher than those of other extracts. The ferric reducing antioxidant power and reducing power of EE were 189.00~974.80 μM , and 0.12~0.82, respectively. The tyrosinase inhibitory activity of EE (23.25~67.20%) improved with an increase treatment concentration. The antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of EE were significantly higher than those of other extracts. In conclusion, we provided experimental evidence that extracts from *Mori ramulus* have potential as functional materials.

Key words: *Mori ramulus*, extraction method, phenolic compounds, antioxidant activity, tyrosinase inhibition activity

서 론

인간을 비롯한 모든 생명체에서 산소는 생체 내 필요한 에너지를 만드는 과정에서 중요한 역할을 하지만 이들 산소 중 일부분(약 2~3%)은 자유 라디칼 반응에 의해 superoxide anion radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($\text{OH}\cdot$), peroxy radical($\text{ROO}\cdot$) 등을 포함한 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 전환된다(1). 이러한 활성 산소종과 유리라디칼은 체내에서 세포막 손상, DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래하여 생체기능을 저하시킴으로써 노화를 유발할 뿐만 아니라 암, 동맥경화, 심장병, 당뇨병, 류마티스성 관절염 등과 같은 여러 질환의 원인으로 알려져 있다(2). 정상 상태에서 세포는 활성 산소의 유리를 제거하는 항산화 방어시스템을 지니고 있다. 그러나 활성 산소종의 과잉 축적은 생체 내 항산화 방어 시스템의 산화·환원 항상성을 깨뜨려 산화적 스트레스를 유발시킨다(3). 활성 산소종의 원인이 되는 흡연, 음주, 격렬한 운동, 스트레스, 각종 환경오염물질 및 약물 등에 과

도하게 노출되어 현대인에게는 산화적 스트레스를 경감시킬 수 있는 항산화제가 필수적이다(4). 이와 같이 현대인들의 관심이 높아짐에 따라 항산화제에 대해 전 세계적으로 활발히 연구가 진행되고 있으며, 특히 천연물의 미량 원소 중 폴리페놀성 화합물 유래 항산화제가 질환의 예방 및 치료제로서 관심을 끌고 있다(5,6). 항산화 활성이 우수한 천연물을 활용하기 위해서는 천연물 소재에 대한 활성의 탐색과 별도로 생물자원의 특징을 고려한 제조공정에 관한 검토가 필요하다(7). 적은 공간과 비용으로 다량의 기능성 소재를 생산할 수 있어야 하며, 저렴한 비용으로 동일한 양의 천연물로부터 가급적 다량의 유용물질을 생산할 수 있는 추출공정이 개발되어야 한다(8). 열수추출은 일반적으로 식품의 추출방법으로 많이 이용되어 왔으나 가용성분 위주의 추출로 인해 낮은 추출수율, 높은 에너지소비 및 열에 의한 유용성분 파괴 등과 같은 단점이 있으므로 천연물의 추출효율을 증가시키기 위하여 에탄올추출, 초음파추출, 가압추출 등 여러 가지 추출방법이 시도되고 있다(8). 에탄올추출은 추출시간을 단축시키고 유용물질을 가용성화 시켜 높은 추출효율을 나타내는 것으로 알려져 있으며(9), 초음파추출은 열에 의한 성분 파괴를 줄일 수 있고(10), 가압추출은 가압가열 처리를 하는 동안 발생하는 다양한 화학적 변화에 의해 생리활성물질이 증가한다는 연구가 보고된바 있다(11).

Received 22 July 2014; Accepted 2 September 2014

Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-702, Korea
E-mail: jhhong@cu.ac.kr, Phone: +82-53-850-3218

상지(桑枝, *Mori ramulus*)는 뽕나무과(*Moraceae*)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 어린가지로 늦은 봄과 초여름에 절취하여 쇠건한 것으로 눈상지, 상조 등의 이름이 있다(12). 성상은 긴 원주형으로 준비된 것도 있으며 길이는 일정하지 않고 지름은 0.5~1 cm이다. 표면은 회황색 또는 황갈색으로 많은 황갈색의 점상의 피공과 가는 세로 주름이 있으며, 회백색의 약간 반원형인 잎의 흔적과 황갈색의 액아가 있다. 껍질은 단단하고 껴인 면이 섬유성이며 우리나라 및 중국의 전 지역에 분포하고 있다. 상지에 대한 연구로는 고혈압 및 동맥경화에 미치는 영향(13), 총 콜레스테롤 및 혈압에 미치는 영향(14,15), 당뇨병 동물모델에서 항당뇨 효과(16-18), 고지방식이 흰쥐의 체중 변화와 지질 대사에 미치는 영향(19), 콜라겐 유발 관절염 랫트에 미치는 영향(20) 등이 보고되어 있다. 또한 Song 등(21)은 상지를 화장품 소재로 활용하고자 70% 에탄올로 추출하여 tyrosinase 저해 활성 및 정상 인체 멜라닌세포 및 흑색종 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 평가하였다. 이에 상지 추출물이 미백효과가 있음을 확인하였으며, 그 외 Shin(22), Park(23), Jeong 등(24)의 연구에서 화장품 소재로의 활용 가능성이 있다고 보고되어 있다. Jeong과 Noh(25)는 상지 50% 메탄올 추출물의 탈모 개선에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과 유의적인 개선효과가 나타나 탈모 개선효과가 있음을 확인하였다. 이와 같이 상지의 다양한 기능이 보고되고 있으나, 산업적인 활용을 위한 추출방법에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 다양한 유용성분과 생리활성을 가진다고 알려져 있는 상지의 산업적 이용 증대 및 고부가가치 소재 개발의 일환으로 추출방법에 따른 상지 추출물의 항산화 활성을 조사하였으며, 가장 효율적인 추출방법을 확립하는 데 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 상지는 국내에서 수확한 것을 (주)류충현약용버섯(Andong, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 상지를 음지에서 자연 건조하여 수분이 30~40%일 때 분쇄기(FM-909W, Hanil, Co., Sejong, Korea)로 분쇄하여 -20°C 이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다.

추출물의 제조

상지 추출물의 제조는 상지 분말 30 g에 증류수를 고형분 대비 20배 첨가하여 아래와 같이 열수추출(HE, hot water extraction), 초음파추출(UE, ultrasonic extraction) 및 가압추출(PE, pressured extraction) 방법으로, 50% 에탄올 추출(EE, 50% ethanol extraction)은 상지 분말 30 g에 50% 에탄올을 고형분 대비 20배 첨가하여 추출물을 제조하였다.

열수추출 및 50% 에탄올추출은 각각 100°C 및 80°C에서 3시간 동안 환류냉각추출기(CA-1112, Eyela Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였고 초음파추출은 ultrasonic processor(VCX 400, Sonic & Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 이용하여 25°C, 40 kHz, 400 W에서 3시간 동안 추출하였다. 또한 가압추출은 121°C, 1.2기압에서 3시간 동안 추출하였다. 각각의 추출물은 불순물을 제거하기 위하여 여과지(No. 1, Whatman International Ltd., Leicestershire, UK)를 이용하여 여과시켰다. 여과된 용액은 감압농축기(Model N-1N, Eyela Co.)를 사용하여 감압농축한 뒤, 동결건조기(FreeZone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)로 건조하여 -70°C 이하의 암소에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

추출수율, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량

추출수율은 추출방법별 추출물을 동결건조 시켜서 건물중량을 구한 다음 추출물 제조에 사용한 원료 건물량에 대한 백분율로 나타내었다.

총 페놀 함량 측정은 Folin-Denis법(26)에 따라 1 mg/mL 농도로 희석한 시료 1 mL에 1 N Folin Ciocalteu reagent 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합하여 반응시킨 후 20% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하고 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정은 Jia 등(27)의 방법에 따라 1 mg/mL 농도로 희석한 시료 1 mL에 5% NaNO₂ 150 µL를 혼합하여 실온에서 6분간 반응시킨 다음 10% AlCl₃ 300 µL와 혼합하여 다시 실온에서 5분간 반응시킨 후 1 N NaOH 1 mL와 혼합한 다음 분광광도계(Ultraspec 2100 pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 측정

ORAC 측정은 Talcott와 Lee(28)가 항산화 활성 측정에 사용한 분석법을 이용하였다. 본 시험에서 시료 및 Trolox의 농도별 희석과 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(61.6:38.9, v/v, 0.75 M K₂HPO₄ and 0.75 M NaH₂PO₄)를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 Trolox(water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Co.) 10 µL를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고, 측정 기기는 multilabel plate readers(VICTOR³, Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 485 nm에서

전자가 여기(excitation)되고 538 nm에서 방출(emission)되게 조절하여 본 실험에 적용되었다.

DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 측정(29)은 DPPH의 환원력을 이용하여 측정하였다. 즉 시료 0.5 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample}_{\text{absorbance}}}{\text{control}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical 소거 활성 측정(30)은 7.4 mM ABTS(Sigma-Aldrich Co.)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 희석하였다. 희석된 용액 180 μ L에 시료 20 μ L를 혼합하여 정확히 1분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거 활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample}_{\text{absorbance}}}{\text{control}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

Superoxide radical 소거 활성 측정

Superoxide radical 소거 활성 측정은 Nishikimi(31)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 500 μ L에 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 100 μ L, 100 μ M phenazine methosulfate(PMS) 200 μ L를 혼합하여 반응시킨 후 500 μ M nitro blue tetrazolium(NBT) 200 μ L 및 500 μ M β -nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) 400 μ L를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide radical 소거 활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Superoxide radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample}_{\text{absorbance}}}{\text{control}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(32)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buf-

fer(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride(FeCl_3) 2.5 mL를 첨가하여 제조하였다. 시료 30 μ L에 제조된 FRAP reagent 900 μ L와 증류수 90 μ L를 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Ultraspec 2100 pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

환원력 측정

환원력 측정은 Oyaizu(33)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 1 mL에 0.2 M phosphate buffer(pH 6.6) 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 용액 2.5 mL를 가한 후 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 10% trichloroacetic acid 용액 2.5 mL를 가한 후 원심분리 한 뒤, 상등액 2.5 mL에 증류수 2.5 mL와 0.1% FeCl_3 용액 0.5 mL를 혼합한 다음 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성은 Kameyama 등(34)의 방법을 응용하여 96 well plate에 시료 100 μ L, 0.175 M phosphate buffer(pH 6.8) 40 μ L, 5 mM L-DOPA 40 μ L를 순서대로 넣고 mushroom tyrosinase(2,000 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 첨가하여 37°C 배양기에서 10분 동안 반응시킨 다음 생성된 DOPA chrome를 microplate reader(UVM-340, ASYS Co., Eugendorf, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample}_{\text{absorbance}}}{\text{control}_{\text{absorbance}}}\right) \times 100$$

통계처리

실험결과는 3회 반복실험의 평균 \pm 표준편차로 나타내었고 SPSS(19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성 ($P < 0.05$)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

추출수율, 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC

추출방법에 따른 상지 추출물의 추출수율, 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 및 ORAC 값은 Table 1과 같다. 추출수율은 각각 열수추출(HE), 50% 에탄올추출(EE), 초음파추출(UE) 및 가압추출(PE)에서 유의적인 차이를 나타내었으며, PE(3.07%), UE(1.43%), EE(1.18%) 및 HE(1.07%) 순

Table 1. Extraction yield, total phenolic, total flavonoid contents, and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) of extracts from *Mori ramulus*

Extraction method ¹⁾	Yield (dry basis, %)	Total phenolic (Tannic acid mg/g)	Total flavonoid (Rutin mg/g)	ORAC (Trolox μ M/g FW)
HE	1.07 \pm 0.02 ^d	247.06 \pm 2.32 ^b	35.32 \pm 1.19 ^{NS2)}	2,687.52 \pm 221.44 ^b
EE	1.18 \pm 0.04 ^c	334.66 \pm 0.65 ^a	35.64 \pm 0.73	3,483.37 \pm 189.91 ^a
UE	1.43 \pm 0.05 ^b	206.56 \pm 1.53 ^d	34.49 \pm 3.21	2,300.45 \pm 176.36 ^c
PE	3.07 \pm 0.09 ^a	210.80 \pm 1.33 ^c	33.59 \pm 2.41	2,117.62 \pm 178.35 ^c

¹⁾HE, hot extraction; EE, 50% ethanol extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction.

²⁾NS: not significant.

All values are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

Mean with different superscript letters (a-d) within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

으로 가압추출이 가장 높았고 열수추출 구간이 가장 낮았다. PE가 높은 추출수율을 나타내는 것은 고압 하에서 단백질이 변성되거나 세포막이 비가역적으로 분해되어 막 투과성이 증가됨에 따라 물질 이동이 용이해지는 관계로 보다 많은 성분이 세포 밖으로 용출된 것이라 판단되며, 이는 돼지감자 잎의 환류냉각추출(29.88%)에 비해 가압가열추출(31.65%)에서 수율이 향상된다고 보고한 Kim 등(6)의 연구 결과와 유사하였다. 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 EE에서 각각 334.66 mg/g 및 35.64 mg/g으로 가장 많이 함유되어 있었으며 다른 추출방법에 비해 상지를 50% 에탄올로 추출하였을 때 페놀성물질의 함량이 가장 우수함을 확인하였다. 50% 에탄올은 물과 유기용매가 혼합되어 있으므로 상지에 함유되어 있는 페놀성물질의 용출이 용이했기 때문으로 사료되며, 이는 추출방법 및 용매에 따른 청나래 고사리의 총 페놀 함량 분석에서 추출방법에 관계없이 80% 에탄올로 추출했을 때 추출수율이 가장 우수하다는 보고와 유사하였다(8). 상지의 추출방법에 따른 총 페놀 함량은 206.56~334.66 mg/g으로 유의적인 차이를 나타내었으나, 총 플라보노이드 함량은 33.59~35.64 mg/g으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. ORAC 분석은 AAPH로부터 유도된 peroxyl radical에 대한 소거 활성을 평균도로 측정하며, peroxyl radical 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 측정 방법이다(35). ORAC 측정 결과 EE에서 g당 3,483.37 μ M로 가장 우수한 값을 나타내었으며, HE (2,687.52 μ M), UE(2,300.45 μ M) 및 PE(2,117.62 μ M) 순으로 분석되었다. Table 1에서 나타난 것처럼 ORAC 값은 페놀화합물의 함량이 상대적으로 높은 50% 에탄올 추출물(334.66 mg/g)에서 가장 높은 것을 확인하였다. Ronald 등(36)은 총 페놀 함량이 증가함에 따라 ORAC 값이 증가한다고 보고하였는데, 본 연구 결과와 일치하였다.

DPPH 및 ABTS radical 소거 활성

상지 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거 활성은 Fig. 1과 같다. DPPH radical 소거 활성은 EE 실험구가 100~1,000 μ g/mL 농도에서 17.34~65.84%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 특히 1,000 μ g/mL 농도에서는 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid(77.49%)의 약 0.85배의 활성을

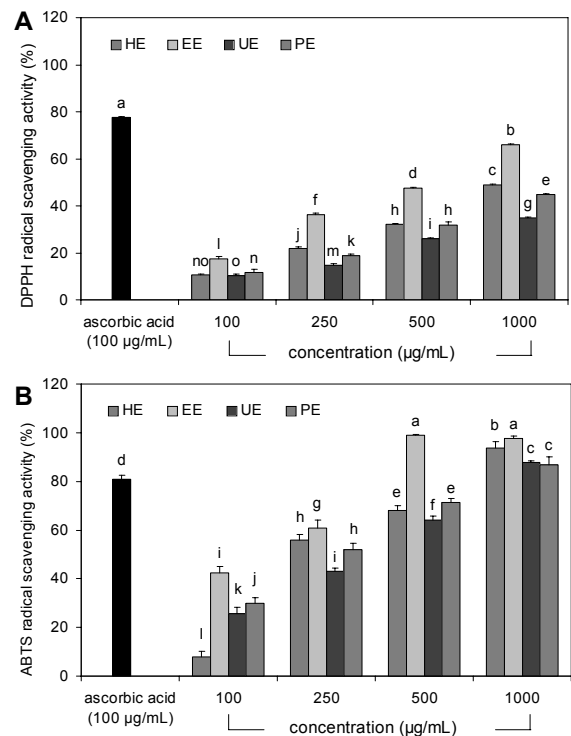


Fig. 1. DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity of extracts from *Mori ramulus*. Means \pm SD (n=3) with different letters (a-o) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). HE, hot extraction; EE, 50% ethanol extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction.

나타내었다. 다른 추출방법은 100~1,000 μ g/mL 농도에서 HE 10.46~48.95%, PE 11.75~44.64% 및 UE 10.32~34.82% 순이었으며, 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하였다. Shin(22)은 상지 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 조사한 결과 10 μ g/mL에서 16% 및 100 μ g/mL에서 73%로 오미자, 홍화씨와 유사한 결과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 높은 활성을 나타낸다고 보고하였다. ABTS radical 소거 활성은 모든 시료에서 농도가 증가함에 따라 소거 활성이 증가하였으며, 특히 EE에서 42.35~97.52%로 가장 높은 활성을 나타내어 DPPH radical 소거 활성과 유사한 경향을 나타내었다. 1,000 μ g/mL 농도에서 EE 97.52%로 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며, HE

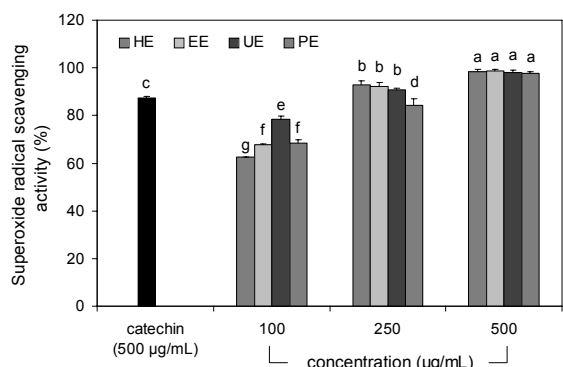


Fig. 2. Superoxide radical scavenging activity of extracts from *Mori ramulus*. Means±SD (n=3) with different letters (a-g) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). HE, hot extraction; EE, 50% ethanol extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction.

93.86%, UE 87.82%, PE 86.64% 순이었다. Lim 등(37)은 상엽, 상지 및 상백피 메탄올 추출물의 ABTS radical 소거 활성을 조사한 결과 상엽에서 유의적으로 높은 활성을 나타냈으며, 상지 및 상백피 3~30 µg/mL에서 약 5~10%로 다소 낮은 활성을 나타내었으나 이는 합성 항산화제인 BHA와 ascorbic acid와 비교하기 위해 낮은 농도에서 조사한 결과 때문이라 판단된다. 모든 시료에서 ABTS radical 소거 활성이 DPPH radical 소거 활성에 비하여 높은 활성을 나타내었는데, 이는 다수의 연구에서 ABTS radical 소거 활성의 경우 DPPH radical 소거 활성보다 수소 공여 항산화 물질과 chain breaking 항산화 물질을 모두 측정할 수 있어 더 높은 활성을 나타낸다고 보고하여 본 연구 결과와 일치하였다 (30,38).

Superoxide radical 소거 활성

추출방법에 따른 상지 추출물의 superoxide radical 소거 활성은 Fig. 2와 같다. Superoxide radical 소거 활성은 추출방법별 100~500 µg/mL 농도에서 62.56~98.74%로 높은 소거 활성을 나타냈으며 농도 의존적으로 증가하였다. HE, EE, UE 및 PE에서 추출된 상지 추출물 500 µg/mL 농도에서 각각 98.26%, 98.74%, 97.95% 및 97.63%로 높은 활성을 나타내었으며, 특히 모든 추출방법에서 500 µg/mL 농도는 양성대조군으로 사용한 catechin(87.36%)보다 높은 활성을 나타내어 상지 추출물의 superoxide radical 소거 활성이 우수함을 확인하였다. Hong(39)은 생강나무 가지 및 잎 추출물의 superoxide radical 소거 활성을 조사한 결과 200 µg/mL에서 생강나무 가지 열수 추출물은 73.27%, 50% 에탄올 추출물은 79.95%로 높은 활성을 나타내었다고 보고하였는데, 본 연구의 상지 추출물과 유사한 활성을 나타냄을 확인하였다. 추출방법에 따른 상지 추출물의 radical 소거 활성을 조사한 결과 각 실험에 사용되는 radical에 따라 활성이 서로 다르게 나타남을 확인하였으며 이를 저해하는 활성을 나타내는 물질들의 용출에도 차이가 있을 것으

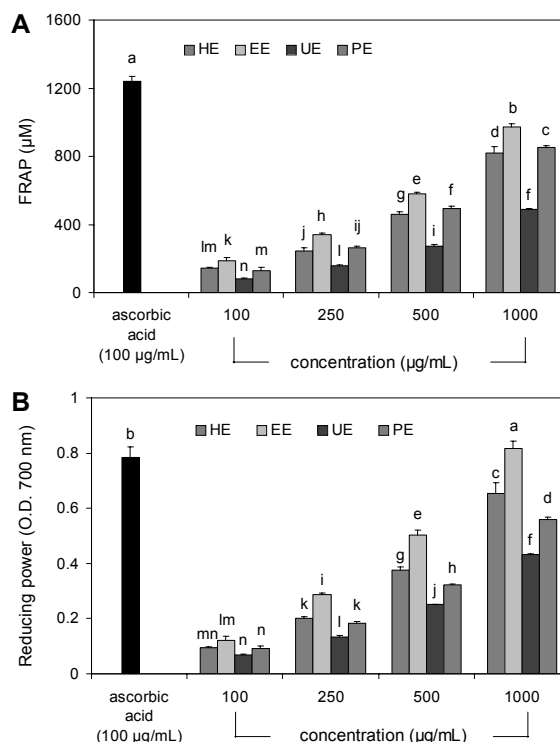


Fig. 3. FRAP (ferric reducing antioxidant power) (A) and reducing power (B) of extracts from *Mori ramulus*. Means±SD (n=3) with different letters (a-n) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). HE, hot extraction; EE, 50% ethanol extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction.

로 사료된다.

FRAP 및 환원력

상지 추출물의 FRAP 및 환원력은 Fig. 3과 같다. FRAP는 EE 구간이 100~1,000 µg/mL 농도에서 189.00~974.80 µM로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 특히 1,000 µg/mL 농도에서는 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid(1,239.88 µM)의 대략 0.8배의 활성을 나타내었다. 100~1,000 µg/mL 농도에서 HE 145.48~818.28 µM, UE 81.85~488.81 µM, PE 128.68~854.55 µM로 모든 추출물에서 농도 의존적으로 FRAP가 증가됨을 확인하였다. Jung 등(40)은 편백나무 및 소태나무 잎의 80% 메탄올 추출물에 대해 FRAP를 조사한 결과 각각 1.77 µM/µg 및 8.52 µM/µg으로 분석되어 소태나무 잎 추출물의 FRAP 함량이 높다고 보고하였다. 환원력은 추출방법별 모든 구간이 100~1,000 µg/mL 농도에서 0.068~0.817로 높은 활성을 나타내었으며 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 EE의 1,000 µg/mL 농도에서 0.82로 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid(0.78)보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 다른 추출방법에서의 환원력은 1,000 µg/mL에서 HE(0.65), PE(0.56) 및 UE(0.43) 순으로 활성이 나타났으며 FRAP와 유사한 경향을 나타내었다. 총 페놀 함량이 유의적으로 높았던 추출방법인 EE에서 다른

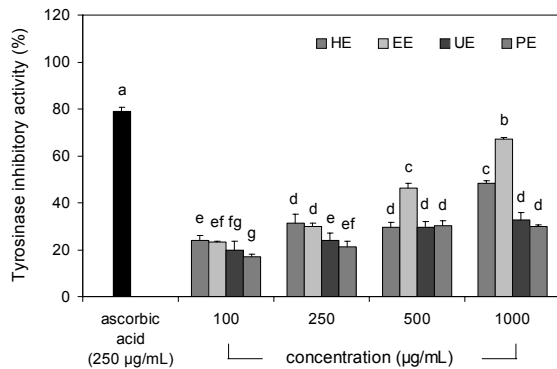


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory activity of extracts from *Mori ramulus*. Means±SD (n=3) with different letters (a-g) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). HE, hot extraction; EE, 50% ethanol extraction; UE, ultrasonic extraction; PE, pressured extraction.

추출방법에 비해 FRAP 및 환원력이 높음을 확인하였으며, Osawa(41)는 식물로부터 추출된 추출물은 페놀성물질의 함량에 영향을 받으며 다양한 항산화 활성을 보인다고 보고하였다.

Tyrosinase 저해 활성

추출방법에 따른 상지 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 Fig. 4와 같다. Tyrosinase 저해 활성은 EE 100~1,000 µg/mL 농도에서 23.25~67.20%로 높은 활성을 나타내었으며, 특히 1,000 µg/mL 농도에서는 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid(78.96%)의 약 0.85배의 활성을 나타내었다. 100~1,000 µg/mL 농도에서 HE, UE 및 PE가 각각 23.90~48.42%, 19.85~32.84% 및 17.03~29.78%로 분석되어 모든 시료에서 농도 의존적으로 tyrosinase 저해 활성이 증가하였다. Song 등(21)은 상지의 70% 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 조사한 결과 10~100 µg/mL에서 농도 의존적으로 저해 활성이 증가하였으며, 정상 인체 멜라닌 세포에서 43.2~95.4% 및 B16 흑색종 세포에서 54.4~89.1%로 저해 활성을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Shin(22)은 상지 70% 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 조사한 결과 10 µg/mL에서 43% 및 100 µg/mL에서 74%로 인삼, 약쭈 등 다른 약용식물보다 유의적으로 높은 활성을 나타내어 멜라닌 생합성을 억제할 수 있는 화장품 개발에 활용될 수 있을 것이라 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 따라서 추출방법에 따른 상지 추출물의 다양한 항산화 활성의 결과를 살펴볼 때, 50% 에탄올로 추출한 실험구간이 가장 우수하여 상지를 기능성 소재로 개발하기 위한 추출방법으로 활용 가능하다 사료된다.

요 약

본 연구에서는 다양한 생리활성을 가진다고 알려져 있는 상지의 산업적 이용 증대 및 고부가가치 소재 개발을 목적으로

열수추출, 50% 에탄올추출, 초음파추출 및 가압추출 공정을 사용하여 상지 추출물의 추출방법에 따른 항산화 활성을 조사하였다. 추출수율은 가압추출, 초음파추출, 50% 에탄올추출 및 열수추출 순으로 나타났으며, 총 페놀 함량 및 플라보노이드 함량은 50% 에탄올 추출물에서 각각 334.66 mg/g 및 35.64 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, ORAC은 50% 에탄올 추출물에서 g당 3,483.37 µM로 가장 높은 값을 나타내었다. DPPH radical 소거 활성은 50% 에탄올 추출물이 100~1,000 µg/mL 농도에서 17.34~65.84%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, ABTS radical 소거 활성은 모든 시료에서 농도가 증가함에 따라 소거 활성이 증가하였다. Superoxide radical 소거 활성은 추출방법별 100~500 µg/mL 농도에서 62.56~98.74%로 높은 소거 활성을 나타내었다. FRAP 및 환원력은 50% 에탄올 추출물이 100~1,000 µg/mL 농도에서 각각 189.00~974.80 µM 및 0.12~0.82로 가장 우수하였다. Tyrosinase 저해 활성은 50% 에탄올 추출물이 1,000 µg/mL에서 67.20%로 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 50% 에탄올 추출방법이 상지의 항산화 활성이 우수한 추출물 제조방법으로 적합하였으며 산업적으로 적용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2013년도 산학연협력 기술개발사업(No.C0135499)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telsler J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
- Kim MJ, Chu WM, Park EJ. 2012. Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1041-1048.
- Jo YH, Park JW, Lee JM, Ahn GH, Park HR, Lee SC. 2010. Antioxidant and anticancer activities of methanol extracts prepared from different parts of Jangseong Daebong persimmon (*Diospyros kaki* cv. Hachiya). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 500-505.
- Kim JW, Kim JK, Song IS, Kwon ES, Youn KS. 2013. Comparison of antioxidant and physiological properties of Jerusalem artichoke leaves with different extraction processes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 68-75.
- Cho YJ, Lee SK, Ahn YH, Pyee JH. 2003. Development of ultrasonication-assisted extraction process for manufacturing extracts with high content of pinosylvin from pine

- leaves. *J Korean Soc Agric Mach* 28: 325-334.
8. Shin SL, Lee CH. 2011. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J Life Sci* 21: 56-61.
 9. Kim DI, Hong JH. 2012. Optimization of ethanol extraction conditions for functional components from *Lespedeza cuneata* using response surface methodology. *Korean J Food Cookery Sci* 28: 275-283.
 10. Park EJ, Ahn JJ, Kim JS, Kwon JH. 2013. Antioxidant activities in freeze-dried and hot air-dried schizandra fruit (*Schizandra chinensis* Baillon) at different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J Food Sci Technol* 45: 667-674.
 11. Hwang IG, Woo KS, Jeong HS. 2011. Biological activity and heat treatment processing of foods. *Food Sci Ind* 44: 56-65.
 12. The Food and Drug Administration. 2006. *National standard of traditional medicinal (herbal and botanical) materials*. Seoul, Korea. p 209.
 13. Jeong JC, Ko KC, Han DS. 1978. Effects of *Morus bombycis* Doidzumi stem on hypertension and arteriosclerosis. *J Kyunghee Orient Med Coll* 3: 17-25.
 14. Hur JH, Lee DH. 1978. Study on the therapeutic effects on the hypercholesteremia and bloodpressure of aqueous extract of *Mori radidis* in the rabbits. *J Kyunghee Orient Med Coll* 1: 95-99.
 15. Cha JY, Cho YS. 2001. Effect of stem bark extract from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the concentrations of lipid and tissue lipid peroxidation in the cholesterol-fed rats. *Korean J Food Sci Technol* 33: 128-134.
 16. Flier JS, Kahn CR, Roth J. 1979. Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance. *N Engl J Med* 300: 413-419.
 17. Ham IH, Jeong ES, Lee BH, Choi HY. 2008. The study on anti-hypertensive and anti-diabetic effect of *Mori ramulus*. *Korea J Herbology* 23: 203-212.
 18. Hwang JG. 2004. Effects of the *Ramulus mori* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *MS Thesis*. Kyung Hee University, Seoul, Korea. p 1-32.
 19. Kim HS, Jeong JC. 2002. Effects of *Ramulus mori* extract on obesity and lipid metabolism in high fat diet rats. *J Korean Oriental Med* 23: 64-72.
 20. Roh SS, Ku SK, Seo YB. 2009. Effects of *Mori ramulus* on collagen-induced arthritis rat: expression of immunocells in draining lymph node. *Kor J Ori Physiol Pathol* 23: 1106-1115.
 21. Song MH, Hwang JY, Park YL, Whang KU. 2000. The inhibitory effect of *Ramulus mori* extracts on tyrosinase activity in normal human melanocytes and B-16 melanoma cells. *J Soonchunhyang Med Cell* 6: 391-400.
 22. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food & Nutr* 14: 568-572.
 23. Park SY. 2009. Whitening effects of *Mori ramulus*, *Mori cortex radidis* and *Mori folium* herbal-acupuncture solution after fermentation and heating. *MS Thesis*. Daegu University, Gyeongbuk, Korea. p 1-32.
 24. Jeong HL, Kim HW, Kim JH, Kim JH, Kim DU. 2012. Cosmetic effect of mixed plant extracts including *Saururus chinensis*, *Morus bombycis* stem and *Morus papyrifera* stem. *Korean Chem Eng Res* 50: 610-613.
 25. Jeong SI, Noh YH. 2008. Impact of *Ramulus mori* extract and ayurveda oil on hair loss treatment. *J Kor Soc Cosm* 14: 1436-1442.
 26. Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 16: 144-158.
 27. Jia Z, Tang M, Wu J. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. *Food Chem* 64: 555-559.
 28. Talcott ST, Lee JH. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J Agric Food Chem* 50: 3186-3192.
 29. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 30. 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.
 31. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commu* 46: 849-854.
 32. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 230: 70-76.
 33. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reaction-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr* 44: 307-315.
 34. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Urabe K, Hearing VJ. 1993. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPA chroomeromerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol* 100: 126-131.
 35. Alarcon E, Campos AM, Edwards AM, Lissi E, Lopez-Alarcon C. 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem* 107: 1114-1119.
 36. Ronald LP, Xianli W, Karen S. 2005. Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
 37. Lim CY, Lim SH, Cho SI. 2014. Anti-oxidative effects of *Mori folium*, *Mori ramulus* and *Mori cortex radidis*. *J Daejeon Orient Med Coll* 22: 93-101.
 38. Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS, Han CS. 2007. Drying and antioxidant characteristics of the shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom in a conveyer type far-infrared dryer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 250-254.
 39. Hong JH. 2013. Physiological activities of leaf and twig extracts from *Lindera obtusiloba* Blume. *Korean J Food Cookery Sci* 29: 593-580.
 40. Jung YT, Lee IS, Whang K, Yu MH. 2012. Antioxidant Effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. *J Life Sci* 22: 354-359.
 41. Osawa T. 1994. Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In *Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics*. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p 241-251.