

Biological Activities of Extracts from *Cornus kousa* Fruit

Eun-Ho Lee · Seon-Ho Lee · Young-Je Cho* 

산딸나무(*Cornus kousa*) 열매 추출물의 생리활성

이은호 · 이선호 · 조영제*

Received: 30 June 2015 / Accepted: 26 August 2015 / Published Online: 31 December 2015
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

Abstract The extracted phenolic compounds from *Cornus kousa* fruit for biological activities as functional resources were examined. The phenolic compounds which were extracted with water and 40% ethanol from *Cornus kousa* fruit were 7.04 ± 0.27 and 4.47 ± 0.18 mg/g, respectively. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging activity of water and ethanol extracts were 84% and 86% at 50 μ g/mL phenolics, respectively. The 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical decolorization activity of water and ethanol extracts were 84 and 95% at 100 μ g/mL phenolics, respectively. Antioxidant protection factor in water and ethanol extracts at 50 μ g/mL phenolics were 1.93 and 1.82 PF, respectively. Thiobarbituric acid reactive substance were 69% in water extracts and 89% in ethanol extracts at 150 μ g/mL phenolics. The inhibition activity on xanthine oxidase in water and ethanol extracts was 34 and 60%, respectively. The inhibition activity on α -glucosidase was 29% in water extracts and 87% in ethanol extracts. The tyrosinase inhibitory activity was 19% in ethanol extracts. The collagenase inhibition activity of anti-wrinkle effect showed an excellent wrinkle improvement effect as 53% in water extracts and 77% in ethanol extracts at 200 μ g/mL phenolics. The

hyaluronidase inhibition activity as antiinflammation effect of water extracts was confirmed to 34% of inhibition at 200 μ g/mL phenolic. The results can be expected extracts from *Cornus kousa* fruit to use as functional resource for antioxidant, antigout, inhibitor of carbohydrate degradation, antiwrinkle activity and antiinflammation activity.

Keywords biological activity · *Cornus kousa* fruit · extracts · function

서 론

의료 기술의 비약적인 발전과 소비자들의 건강 증진 인식이 높아지면서 건강한 삶을 위한 질병예방 및 수명연장 등의 기대 때문에 기능성 식품에 대한 관심이 매우 증가하고 있다. 이와 관련된 과학적 연구는 건강 관련 기능성 물질의 탐색, 기능성 소재 및 건강식품의 개발에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다 (Kim 등, 1998; Lee, 2013). 소득수준의 향상과 문화적인 글로벌화가 진행되면서 서구화된 식생활과 생활습관의 도입에 의하여 성인병과 같은 만성 질환의 발병이 증가하고 있으며, 이에 대응하는 만성질환 예방 및 건강유지를 위한 천연 생리활성물질에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Son 등, 2009).

산딸나무(*Cornus kousa*)는 산여지 또는 야여지 등으로 불리며 우리나라 중부 이남에 자생하는 층층나무과 식물로 잎은 넓은 난형이나 넓은 타원형이며, 10월에 열리는 산딸나무의 열매는 식용으로 이용되기도 한다 (Lee, 2003). 한방에서는 산딸나무 꽃과 열매를 약용으로 사용하고 있는데, 소창, 지사효과 및 위상 출혈, 이질 등의 치료 효과가 있다고 보고 되어있다 (So, 1994). 산딸나무의 주요 성분으로는 gallic acid, malic acid, tartaric acid 등의 유기산과 isoquercitrin이 분리, 보고된 바 있으며 (Nakaoki와 Morita, 1958), 앞에서 pentaacetyl quercetin, isoquercitrin,

E.-H. Lee · Y.-J. Cho
School of Food science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

S.-H. Lee
Department of Food science & technology, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Republic of Korea

*Corresponding author (Y.-J. Cho: yjcho@knu.ac.kr)

This is an Open Access article 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.

gallic acid, tannin 등의 페놀화합물 등이 보고된 바 있다(Ryu과 Yook, 1971). 같은 속과의 식물인 *C. officinalis* 의 껍질에서는 gallic acid, (+)-gallocatechin, (+)-catechin, quercetin, quercitrin, rutin, isoquercitrin, hyperoside와 같은 8종의 phenolic 화합물을 분리 및 동정하였다(Choi 등, 1998). 특히 산딸나무 열매는 소창(消脹) 및 지사효과(So, 1994) 뿐만 아니라 면역조절기능이 있다고 보고된 바 있다(Kim 등, 2002). 산딸나무 열매의 생리활성 물질로는 최근에 steroid 화합물들이 분리 보고된 바 있으며(Lee 등, 2006), cyanidin 3-O-glucoside, cyanidin 3-O-galactoside 등의 물질이 보고되었다(Vareed 등, 2006). 또한 산딸나무의 조직배양 callus에서는 β -glucogallin, (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-3 등이 분리되었으며(Ishimaru 등, 1993), 줄기와 잎 추출물에서는 HIV-1에 대한 억제효과(Min 등, 2001)가 있는 등 약리성 및 생리활성이 우수한 식물자원인 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 산딸나무 열매로부터 phenolic compound를 추출하여 항산화 효과, 건강 기능성 식품 및 미용식품 활성을 검정하여, 기능성 소재로의 활용가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 연구에서 사용된 산딸나무 열매는 시중에서 생과를 구입하여 45°C dry oven에서 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

산딸나무 열매 추출물의 제조. 생리활성 측정을 위한 추출물의 제조는 물 추출물의 경우 산딸나무 열매 분말 1g을 증류수 200 mL에 침지하여 추출물이 100 mL가 될 때까지 가열한 후 냉각하여 24시간 동안 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 산딸나무 열매 분말 1g에 40% ethanol 100 mL를 첨가하여 4°C의 shaking incubator에서 24시간 동안 교반 추출하였다. 각 추출물은 Whatman No. 1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

Total phenolic 정량. Total phenolic 정량은 추출물 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 잘 섞어 5분간 방치한 후 Na_2CO_3 1 mL를 가하여 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다(Folin과 Denis, 1912).

항산화 효과 측정. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거활성은 Blies의 방법(1958)에 준하여 측정하였으며, 전자공여능(%)은 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times 100$ 으로 나타내었다. 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation decolorization (ABTS)의 측정은 Pellegri 등(1998)에 의해 측정하였고, 저해율(%)은 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times 100$ 으로 나타내었다. Antioxidant protection factor (PF)는 Andarwulan과 Shetty의 방법(1999)으로 측정하였으며, PF는 반응구의 흡광도/대조구의 비로 나타내었다. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 측정은 Buege와 Aust의 방법(1978)에 따라 측정하여 저해율(%)은 1-(반응구의 TBARS μM /대조구의 TBARS μM) $\times 100$ 으로 나타내었다.

Xanthine oxidase (XOase) 저해효과 측정. Xanthine oxidase 저해효과 측정은 Stirpe와 Della Corte의 방법(1969)에 준하여

측정하였다. 즉, 반응구는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 녹인 기질액 2 mM xanthine 3 mL에 효소액(0.05 U/0.1 mL) 0.1 mL과 시료 0.3 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.3 mL 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 종료시 약 20% TCA 1 mL를 가한 후 반응액을 원심분리하여 단백질을 제거하고 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여, 저해율(%)은 (1-시료의 uric acid 함량/대조구의 uric acid 함량) $\times 100$ 으로 계산하였다.

α -Glucosidase 저해효과 측정. α -Glucosidase 저해효과 측정은 Tibbot과 Skadsen의 방법(1996)에 준하여 측정하였다. 50 mM sodium succinate buffer (pH 6.8)에 p -nitrophenol- α -D-glucopyranoside를 용해시켜 1 mg/mL 농도로 기질을 만들고, 기질 2 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하여 반응구에는 시료 0.1 mL, 대조구에는 증류수 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응종료시 약 5% Na_2CO_3 를 첨가하였다. 이때 생성된 p -nitrophenol을 흡광도 470 nm에서 OD값을 측정한 후 표준곡선에 대입하여 양을 환산하고, 저해율(%)은 (1-시료의 p -nitrophenol 함량/대조구의 p -nitrophenol 함량) $\times 100$ 으로 계산하였다.

Tyrosinase 저해효과 측정. Tyrosinase 저해효과 측정은 Vincent와 Hearing의 방법(1987)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 2.3 mL와 기질액 1.5 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (250 U/mL) 0.1 mL와 시료 0.2 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 흡광도 475 nm에서 측정하여, 저해율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance) $\times 100$ 으로 계산하였다.

Collagenase 저해효과 측정. Collagenase 저해효과 측정은 Wunsch와 Heindrich의 방법(1963)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl_2 를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 2 mL를 첨가하고 320 nm에서 흡광도를 측정하여, 저해율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance) $\times 100$ 으로 계산하였다.

Hyaluronidase (HAase) 저해효과 측정. HAase 저해 활성 측정은 Reissig 등의 방법(1995)에 준하여 sodium-hyaluronic acid (HA)로 부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucosazoline 유도체로 변형시킨 후 ndimethylaminobenzaldehyde (DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하였다. 즉, 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase (7,900 U/mL) 0.05 mL와 시료 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 12.5 mM CaCl_2 0.1 mL를 가하고 혼합 후 다시 20분간 배양하였다. 기질로서 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HA (12 mg/mL)를 첨가하여 다시 40분간 배양하고 0.4 N potassium-tetraborate 0.1 mL와 0.4 N NaOH 용액 0.1 mL를 첨가하여 3분 동안 water bath에서 반응 후 완전히 냉각시켰다. 냉각시킨 반응액에 발색시약 DMAB 시약 3 mL를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 600 nm에서 투과율(%)을 측정하여, 저해율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance) $\times 100$ 으로 계산하였다.

통계처리. 본 실험의 결과는 3회 반복하여 측정한 평균값을 나타내었으며, 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계처리는 SPSS 7.5

for windows 프로그램을 이용하여 통계처리 하였고 분산분석 (analysis of variance) 및 duncan의 다중범위검정법(duncans multiple range test)으로 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

용매 종류 및 용매농도가 phenolic 화합물의 용출에 미치는 영향. 식물체에 존재하는 phenolic 화합물은 식물의 방어기작으로 생산되는 2차 대사산물의 한 종류이며, 분자구조 내에 존재하는 phenolic hydroxyl기에 의해 단백질 등 거대 분자들과 결합하는 특성을 나타내어 다양한 생리 기능을 가진다고 보고되어 있다 (Choi 등, 2003). 산딸나무 열매(야여지) 추출물의 고형분에 포함된 phenolic 성분의 함량은 매우 낮게 나타났으며(Fig. 1A), phenolic 함량이 낮은 고형분의 생리활성 역시 매우 낮은 수준으로 나타났다 (Fig. 1B). 따라서 생리활성은 산딸나무 열매 추출물에 함유되어있는 phenolic성분에 의해 효과가 좌우 될 것으로 판단되었다. 위의 결과에 근거하여 산딸나무 열매로부터 생리활성에 관여하는 phenolic 화합물을 추출하기 위하여 추출용매를 달리하여 phenolic 화합물의 용출량을 알아보았다. 그 결과 Fig. 1C에서와 같이 물로 추출하였을 때 7.04 mg/g으로, 다른 유기용매를 사용하여 추출한 것에 비해 상대적으로 phenolic 화합물의 용출량이 높은 것을 알 수 있었으며, 용매에 따른 함량 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 산딸나무 열매의 기능성을 식품에 적용시키기 위하여 인체에 무해한 용매인 ethanol을 다양한 농도의 추출용매로 이용하여 용출된 phenolic 화합물의 함량을 측정된 결과 Fig. 1D에서와 같이 40% ethanol 추출

물에서 4.47 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 위의 결과에 따라 생리기능성 탐색을 위하여 산딸나무 열매추출물을 기능성식품에 적용하고자 추출 용매를 물과 ethanol을 이용하여 물 추출물과 40% ethanol을 이용하여 추출 한 후 생리활성 효과를 탐색하였다.

산딸나무 열매추출물의 항산화 효과. 전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 phenolic 화합물과 같은 전자공여체와 반응하게 되면 phenoxy radical을 생성하게 되며, 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여 결합된 수에 비례하여 DPPH의 진보라색갈이 점점 옅어지게 된다(Aoshima 등, 2004). 산딸나무 열매 추출물을 이용하여 전자공여능을 측정된 결과 Fig. 2A과 같이 50–200 µg/mL의 phenolic 화합물 농도 범위에서 물추출물의 경우 84.42–88.41%의 전자공여능을, ethanol 추출물에서 85.51–87.97%의 전자공여능을 나타내었다. 또한 첨가되는 phenolics의 함량이 증가할수록 전자공여능도 높아져 농도 의존적 양상을 나타내는 것으로 확인되었다. Cho 등(2008)은 진달래 꽃 추출물의 항산화 측정 결과, 열수 추출물과 ethanol 추출물에서 각각 83.2, 89.7%의 전자공여능을 나타낸다고 보고한 것과 비교하면 산딸나무 열매추출물의 전자공여능이 유사한 효능을 가진 것을 알 수 있었다. 추출물들의 상대적인 항산화 측정은 hydrogen-donating antioxidant와 chain breacking antioxidant 모두를 측정할 수 있으며, 항산화 물질이 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS+ free radical을 제거하여 radical의 청록색을 탈색시키는 원리(Pellegrin 등, 1998)를 이용하여 ABTS를 측정된 결과, Fig. 2B와 같이 산딸나무 열매는 저 농도에서는 물 추출물보다 ethanol 추출물에서 상대적으로 더 높은 활성을 나타내었으나 150 µg/mL 이상의 고농도에서는

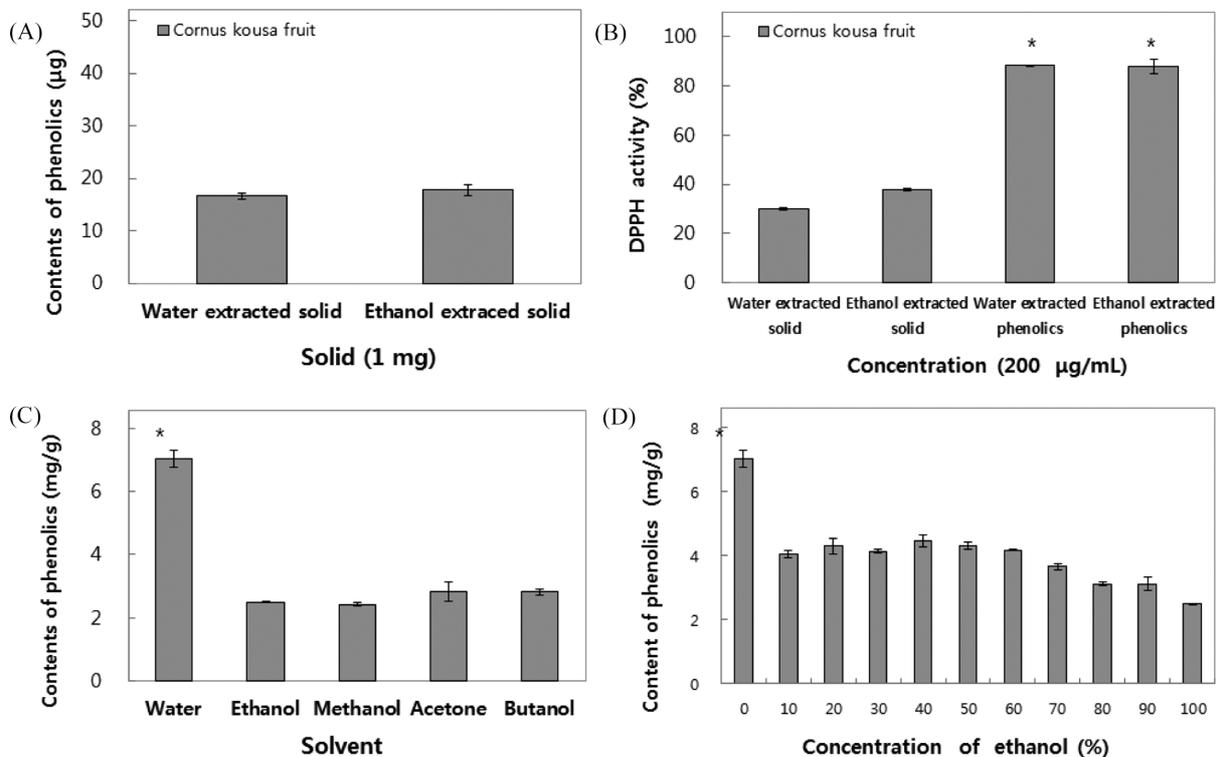


Fig. 1 The effect of various solvents (A) and ethanol concentration (B) on extraction of phenolic from *Cornus kousa* fruit. The data were expressed as the mean ± SD (n=6). *p<0.05.

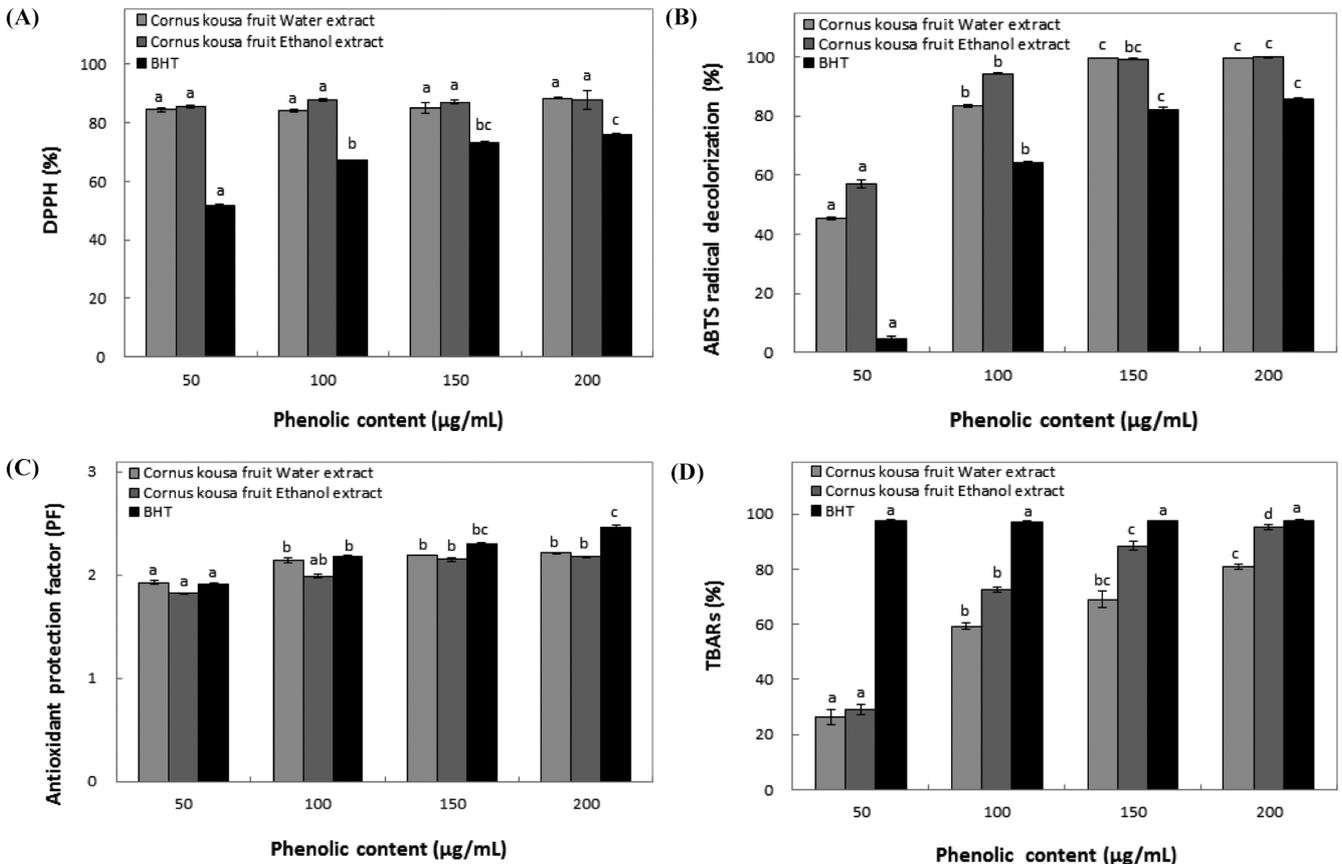


Fig. 2 Antioxidant activity of extracts from *Cornus kousa* fruit. The data were expressed as the mean \pm SD ($n=6$), Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests. A: DPPH, B: ABTS, C: PF, D: TBARs.

물추출물과 ethanol 추출물의 효능이 비슷한 것으로 측정되었으며, 첨가되는 phenolics에 농도 의존적으로 항산화능이 증가하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 산딸나무 열매추출물은 친수성 및 lipophilic 물질에 대한 항산화력이 우수한 것을 알 수 있었다. 산딸나무 열매추출물의 antioxidant protection factor의 차이를 측정한 결과 Fig. 2C에서와 같이 물 추출물의 경우 1.93–2.21 PF를, ethanol 추출물에서는 1.82–2.18 PF의 항산화능을 나타내어, 산딸나무 열매추출물이 지용성물질에 대한 항산화력도 매우 우수하다고 판단되었다. 산딸나무 열매추출물의 thiobarbituric acid reactive substance를 측정한 결과 Fig. 2D에서와 같이 물 추출물보다 ethanol 추출물에서 상대적으로 더 높은 활성을 나타내었으며, ethanol 추출물에서는 200 µg/mL의 농도에서 95.26%의 높은 저해력을 나타내어 지용성 물질의 항산화 효과 측정 지표로 활용되고 있는 PF와 TBARs 측정 (Andarwulan과 Shetty, 1999) 결과에서 높은 억제력이 측정되어 산딸나무 열매 추출물은 지용성 물질에 대한 항산화력도 매우 높다는 것을 확인할 수 있었다.

산딸나무 열매추출물의 xanthine oxidase 효과. XOase는 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요산을 생성하고, 생성된 요산은 관절에 축적되어 심한 통증과 부종을 일으키는 관절염인 통풍을 유발하는 효소로 알려져 왔다(Noro과 Fukushima, 1988). 산딸나무 열매추출물의 XOase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 ethanol 추출물

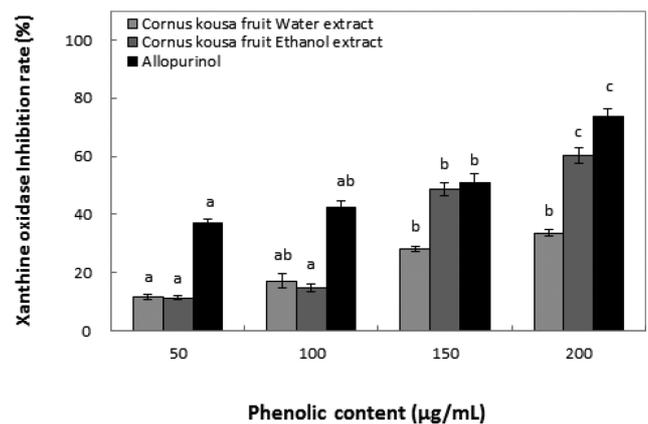


Fig. 3 Inhibition activity of extracts from *Cornus kousa* fruit on xanthine oxidase. The data were expressed as the mean \pm SD ($n=6$), Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

이 물 추출물에 비해 저해율이 상대적으로 높게 나타났으며, 50–200 µg/mL의 phenolics 농도 범위의 물 추출물에서 11.51–33.61%의 저해율을 나타내었고, ethanol 추출물에서 11.25–60.39%의 XOase 저해율을 나타내어, 통풍 억제약제인 allopurinol과 유사한 XOase 저해효과를 나타내었다. Kim 등

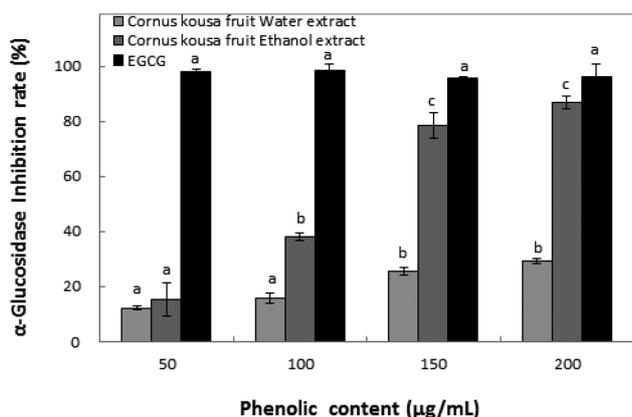


Fig. 4 Inhibition activity of water and ethanol extracts on α -glucosidase from *Cornus kousa* fruit. The data were expressed as the mean \pm SD ($n=6$). Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

(2012)은 유근피 추출물의 phenolic 화합물이 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolics 농도에서 48.1%의 XOase 억제력을 나타내었다고 보고한 것에 비해 산딸나무 열매추출물의 통풍억제력이 더 우수하여 통풍 치료제로서 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

산딸나무 열매추출물의 α -glucosidase 효과. 산딸나무 열매추출물의 효모기원 α -glucosidase 활성저해 효과를 측정된 결과, Fig. 4에서와 같이 물 추출물에서는 12.19–29.31%의 비교적 낮은 효소억제 효과를 나타내었으며, ethanol 추출물에서는 15.12–86.75%로 첨가되는 phenolic 화합물의 농도에 따라 억제효과는 큰 격차를 나타내었다. α -Glucosidase의 억제효과를 나타내기 위해서는 ethanol 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도로 처리하여야 억제효과를 기대할 수 있을 것으로 나타났다. Lee 등(2004b)은 phenolic 물질인 proanthocyanidin이 α -amylase 및 α -glucosidase의 활성을 저해한다고 보고하였으며, 산딸나무 열매추출물의 phenolic 화합물도 이러한 탄수화물 분해 효소의 활성을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 물추출물의 phenolic 함량이 높은 데도 불구하고 동일한 용량의 phenolic을 적용 시켰을 때 물추출물보다 ethanol 추출물의 억제활성이 더 높은 것은 추출물에 존재하는 phenolic의 profile이 다르기 때문인 것으로 추측하였으며, 향후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

산딸나무 열매추출물의 tyrosinase 저해 효과. Tyrosinase는 L-tyrosine에 작용하여 3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)를 거쳐 L-dopaquinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌 형성에 관여하는 단계의 반응을 촉진하는 key enzyme으로 작용한다. 그러므로 tyrosinase는 melanin 생합성 과정의 핵심 효소이므로 tyrosinase 억제제를 피부의 melanin 색소생성을 조절할 수 있는 물질로 사용할 수 있다(Laskin과 Piccinini, 1986). 본 연구에서 산딸나무 열매추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 물추출물에서는 미백 활성이 매우 낮았으며, ethanol 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ phenolics 농도에서 18.74%의 저해 활성을 나타내었으며, 한약재 추출물을 1.0 mg/mL phenolics의 농도로 처리했을 때 34%의 tyrosinase 저해 활성이 나타난다고 보고한 Kim 등(2011)의 결과에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었다.

산딸나무 열매추출물의 collagenase 저해 효과. 피부의 섬유아 세포에서 생성되는 collagen은 세포 외 기질(extracellular matrix)

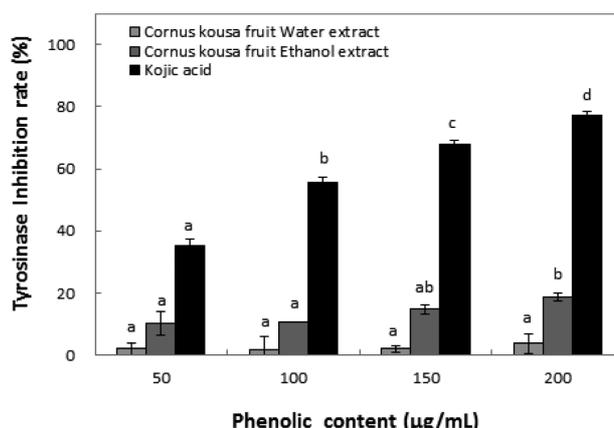


Fig. 5 Inhibition activity of water and ethanol extracts on tyrosinase from *Cornus kousa* fruit. The data were expressed as the mean \pm SD ($n=6$). Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

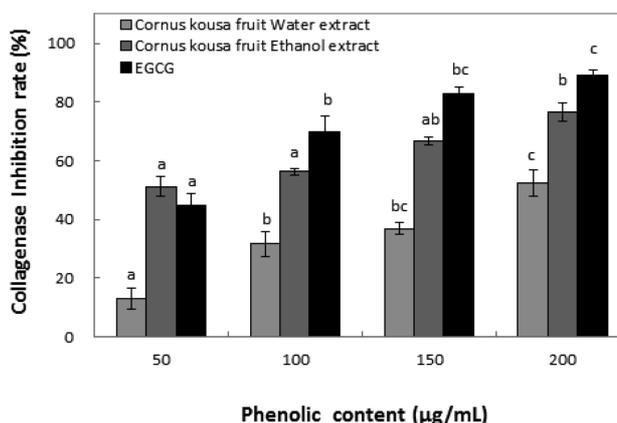


Fig. 6 Inhibition activity of water and ethanol extracts on tyrosinase from *Cornus kousa* fruit. The data were expressed as the mean \pm SD ($n=6$). Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

의 주요 구성성분으로 견고한 3중 나선구조를 가지고 있는 단백질로 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성한다(Jeroma 등, 1998). 이러한 collagen은 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하게 되며, collagen의 감소는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있으며(Wlaschek 등, 2001; El-Domyati 등, 2002), collagenase에 의해 분해된다(Grant과 Alburn, 1959). 본 연구에서는 산딸나무 열매추출물의 농도를 50–200 $\mu\text{g/mL}$ phenolics로 조절하여 collagenase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 6에서와 같이 산딸나무 열매 물추출물에서 13.11–52.46%의 억제력을 나타내었고, ethanol 추출물에서는 51.23–76.64%의 높은 collagenase 억제효과를 나타내어 시중에 주름개선 화장품으로 이용되고 있는 EGCG와 비슷한 효능을 나타내었다. 산딸나무 열매추출물은 collagenase에 대해 농도 의존적으로 억제작용을 나타냄이 확인되었다. 이러한 결과로 보아 산딸나무 열매추출물이 가지는 collagenase 억제활성에 의해 진피층의 뼈대를 구성하는 collagen의 분해를 막아 주름개선을 위한 기능성 미용식품 소재로 활용이 가능할 것으로 판단되었다. Lee 등

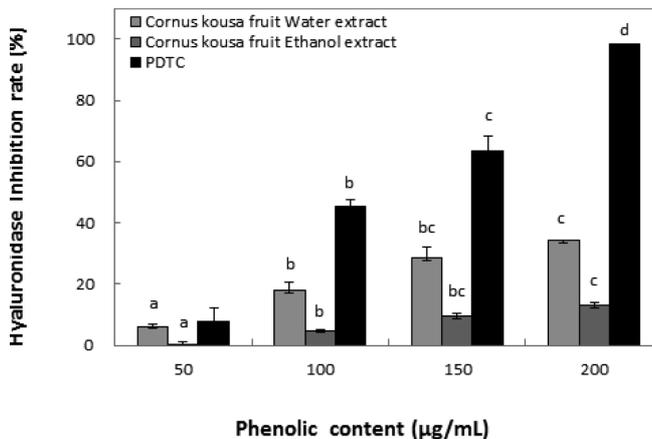


Fig. 7 Inhibition activity of water and ethanol extracts on hyaluronidase from *Cornus kousa* fruit. The data were expressed as the mean \pm SD ($n=6$). Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

(2004a)의 유백피 추출물의 collagenase 저해활성 측정결과, 100 ppm에서 27.6%를 나타내었으며, Barrantes와 Guinea(2003)의 알로에 추출물의 경우 37.1%를 나타내었다고 보고한 것과 비교하면, 산딸나무 열매추출물의 억제효과가 더 우수한 것으로 확인되었다.

산딸나무 열매 추출물의 HAase 저해 효과. 염증반응은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로서 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 염증 형성의 주요 요소인 macrophage의 phagocytic ability는 고분자 다당인 HA에 의해 저해되지만, 저분자 HA는 inflammation, fibrosis collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 HA 분해 효소인 HAase의 활성을 억제함으로써 HA의 고분자 형태를 유지시켜 항염증 효과를 기대할 수 있다(Ghosh, 1994; Cho과 An, 2008). 산딸나무 열매 물 추출물과 ethanol 추출물의 HAase 억제효과를 비교한 결과 Fig. 7에서와 같이 200 µg/mL phenolic의 농도에서 물 추출물에서는 34.21%, ethanol 추출물에서는 13.16%의 염증 억제효과를 보여주었다. 따라서 산딸나무 열매추출물의 농도를 높여 적용한다면 항염증 효과나 아토피 억제효과를 활용하는 제품에 적용할 수 있을 것이라 판단되었다.

초 록

산딸나무 열매로부터 phenolic compounds를 추출 후 생리활성을 검정하여 기능성 소재로 활용가능성을 살펴보았다. 산딸나무 열매에 함유된 페놀성 물질은 물과 40% ethanol을 용매로 하여 추출하였을 때 각각 7.04, 4.47 mg/g 함량을 나타내었다. 추출물의 phenolic 농도를 50–200 µg/mL로 조절하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl를 측정하는 결과, 물 추출물과 ethanol 추출물 50 µg/mL phenolics 농도에서 각각 84, 86%였고, 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical decolorization은 100 µg/mL phenolics 농도의 물 추출물과 ethanol 추출물에서 각각 84%, 95%였다. Antioxidant protection factor는 50 µg/mL phenolics 농도에서 물 추출물과 ethanol 추출물에서 각각 1.93와 1.82 PF로 측정되었으며, TBARS값은 150 µg/mL phenolics

농도에서 물 추출물이 69%, ethanol 추출물에서 89%를 나타내었다. Xanthine oxidase 저해능은 물 추출물과 ethanol 추출물에서 각각 34, 60%로 측정되었으며, α -glucosidase 저해능은 물 추출물과 ethanol 추출물에서 각각 29, 87%의 높은 효능을 보였다. Tyrosinase 저해능을 측정한 결과 ethanol 추출물에서만 19%의 효능을 나타내었다. Collagenase 저해능 측정 결과 200 µg/mL phenolics 농도에서 물 추출물과 ethanol 추출물이 각각 53, 77%의 높은 저해력을 나타내어 주름개선효과가 높았다. 염증억제효과로서 hyaluronidase 저해활성을 측정하는 결과, 200 µg/mL phenolic 농도의 물 추출물에서 34%의 염증억제효과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 산딸나무 열매추출물은 항산화, 통풍억제, 당분해 억제, 주름개선효과, 염증억제 등의 기능성 소재로서 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

Keywords 기능성 · 산딸나무 열매 · 생리활성 · 추출물

References

- Andarwulan N and Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and Agrobacterium-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem* **47**, 1776–80.
- Aoshima H, Tsumoue H, Koda H, and Kiso Y (2004) Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J Agric Food Chem* **52**, 5240–4.
- Barrantes E and Guinea M (2003) Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sci* **72**, 843–50.
- Blios MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199–200.
- Buege JA and Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* **105**, 302–10.
- Cho YJ and AN BJ (2008) Anti-inflammatory effect of extracts from *Cheongmoksang* (*Morus alba* L.) in Lipopolysaccharide stimulated Raw cells. *J Kor Soc Appl Biol Chem* **51**, 44–8.
- Cho YJ, Ju IS, Chun SS, An BJ, Kim JH, Kim MW et al. (2008) Screening of biological activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 276–81.
- Choi HS, Kim MG, Shin JJ, Pack JM, and Lee JS (2003) The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Kor Soc Food Sci Nutr* **32**, 723–7.
- Choi WH, Park WY, Hwang BY, Oh GJ, Kang SJ, Lee KS et al. (1998) Phenolic compounds from the stem bark of *Cornus walteri* Wnager. *Kor J Pharmacogn* **29**, 217–23.
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F et al. (2002) Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* **11**, 398–405.
- Folin O and Denis W (1912) On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* **12**, 239–49.
- 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.
- Grant NH and Album HE (1959) Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum*. *Arch Biochem Biophys* **82**, 245–55.
- Ishimaru K, Arakawa H, and Neera S (1993) Polyphenol production in cell cultures of *Cornus Kousa*. *Phytochemistry* **32**, 1193–7.
- Jeroma SP, Gabrielle L, and Raul F (1998) Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J Invest Dermatol* **90**, 48–54.
- Kim JS, Oh CH, Jeon H, Lee KS, and Ma SY (2002) Immuno-regulatory property of fruit-extracts of *Cornus kousa* Burg. *Korean J Medicinal Crop Sci* **10**, 327–32.
- Kim KB, Jo BS, Park HJ, Park KT, An BJ, Ahn DH et al. (2012) Healthy functional food properties of phenolic compounds isolated from *Ulmus pumila*. *Korean J Food Preserv* **19**, 909–18.

- Kim MR, Hwang JH, Yun JK, Han KH, Do EJ, Lee JS et al. (2011) Antioxidation and anti-aging effect of mixed extract from Korean medicinal herbs. *Kor J Herbology* **26**, 111–7.
- Kim SS, Kim SY, and Lee WJ (1998) Microwave vacuum drying of germinated brown rice as a potential raw material for enzyme food. *Korean J Food Sci Technol* **30**, 1107–13.
- Laskin JD and Piccinini LA (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma. *J Biol Chem* **261**, 16626–35.
- Lee CB (2003) In *Illustrated flora of Korea*. Hyangmunsa, Korea.
- Lee DY, Song MC, Yoo JS, Kim SH, Chung IS, Kim DK et al. (2006) Development of biologically active compounds from edible plant sources. XVII. Isolation of sterols from the fruits of *Cornus kousa* Burg. *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji* **49**, 82–5.
- Lee NY (2013) Antioxidant effect and tyrosinase inhibition activity of seaweeds ethanol extracts. *J Korean Soc Food Nutr* **42**, 1893–8.
- Lee TW, Kim SN, Jee UK, and Hwang SJ (2004a) Anti-wrinkle effect of pressure sensitive adhesive hydrogel patches containing Ulmi cortex extract. *J Kor Pharm Sci* **34**, 193–9.
- Lee WY, Ahn JK, Park YK, and Rhee HI (2004b) Inhibitory effects of proanthocyanidin extracted from distylium racemosum of α -amylase and α -glucosidase activities. *Kor J Pharmacogn* **35**, 271–5.
- Min BS, Kim YH, Tomiyama M, Nakamura N, Miyashiro H, Otake T et al. (2001) Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother Res* **15**.
- Nakaoki T and Morita N (1958) Medicinal resources. XII. Components of the leaves of *Cornus controversa*, *Ailanthus altissima* and *Ricinus communis*. *Yakugaku Zasshi* **78**, 558–9.
- Noro T and Fukushima S (1988) Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull* **31**, 3984–8.
- Pellegrin N, Roberta R, Min Y, and Catherine RE (1998) Screening of diatri carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzo thiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Method Enzymol* **299**, 379–89.
- Reissig JL, Storminger JL, and Leloir LF (1995) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem* **217**, 959–66.
- Ryu KS and Yook CS (1971) On the constituents of leaves of *Cornus kousa* Burg. *Kor J Pharmacogn* **2**, 41–2.
- So BK (1994) In *The pictorial book of chinese medicinal herbs*. Yeo-Gang Press, Korea.
- Son CY, Beak IH, Song GY, Kang JS, and Kwon KI (2009) Pharmacological effect of decursin and decursinol angelate from *Angelica gigas* Nakai. *Yakhak Hoeji* **53**, 303–13.
- Stirpe F and Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* **244**, 3855–63.
- Tibbot BK and Skadsen RW (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin inducible, putative alpha-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* **30**, 229–41.
- Vareed SK, Reddy MK, Schutzki RE, and Nair MG (2006) Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. *Life Sci* **78**, 777–84.
- Vincent J and Hearing Jr (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (Tyrosinase): Purification, properties and reaction catalyzed. *Method on Enzymology* **142**, 154–65.
- Wlaschek M, Tanchewa-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z et al. (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* **63**, 41–51.
- Wunsch E and Heindrich HG (1963) Zur quantitative bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol chem* **333**, 149–51.