

Physiological activities of natural color powders and their mixtures

Jae-Ran Kang, Min-Jung Kang, Hye-Jin Sim, Myeong-Hyo Choi, Jung-Hye Shin*
Namhae Garlic Research Institute, Namhae 52430, Korea

천연소재로부터 분리한 색소분말과 혼합물의 생리활성

강재란 · 강민정 · 심혜진 · 최명효 · 신정혜*
(재) 남해마늘연구소

Abstract

Seven kinds (acacia, cochineal, catechu, grape peel, persimmon, gallnut and clove) of color powders obtained from natural resources and their mixtures were evaluated for their biological activities, such as antioxidant (ABTS and DPPH radicals scavenging), cholesterol absorption, and COX-2 inhibitory activities. Catechu, gallnut and clove were selected for the further studies due to its the best activities. The cholesterol absorption, COX-2 inhibitory, α -amylase inhibitory and α -glucosidase inhibitory activities were measured using the mixtures of catechu, gallnut and clove. The ABTS radical scavenging activity of the seven types of natural color powders were higher than the DPPH radical scavenging activity. The cholesterol absorption activity was significantly higher in cloves. The COX-2 inhibitory activity was significantly lower in acacia. The α -amylase inhibitory activity was higher in catechu and gallnut, indicating that there were no significant difference between two mixtures. The α -glucosidase inhibitory activity was the highest in catechu, which was higher than that of the catechu-containing mixtures. From all these results, a synergistic effect could be obtained when utilizing a mixture of powders rather than using only individual type. Since the activity of each powder was different, further studies will be required for clarifying the interactions between mixtures.

Key words : natural color, antioxidant activity, α -glucosidase, α -amylase, cholesterol

서 론

천연색소는 인류역사의 시작부터 함께 사용되어 왔다고 할 만큼 식용 및 염료 등의 용도로 그 역사가 오래되었으나 현대에는 생산성, 보관의 불편함과 같은 여러 이유로 합성 색소가 그 자리를 대신하여 왔다(1,2). 그러나 최근에는 합성색소의 인체에 대한 위험성과 환경오염과 관련한 문제들이 끊임없이 제기되고, 사회 전반적으로 자연친화적인 생활과 환경에 대한 관심이 증가함에 따라 식물염색에만 국한되어 사용하였던 천연색소를 식품을 비롯하여 화장품,

비누, 모발 염색 및 페인트 등 그 활용 영역을 확대하기 위한 연구들이 진행되고 있다(3,4).

식품에 천연물을 적용하는 것은 용이하지 않지만 천연의 필요성은 더욱 강조되고 있는데, 특히 천연색소는 합성색소와 달리 안전성과 신뢰성이 높아 식품의 고급화를 위해 사용되는 빈도가 높아지고 있다(5). 현재 일반적으로 사용되고 있는 대표적 천연색소로는 코치닐추출색소, 락색소, 홍화황색소, 치자황색소, 치자청색소, 비트레드색소, 적양배추색소, 포도과피추출색소, 베리류색소, 심황색소, 고량색소, 모나스커스색소, 파프리카추출색소, 안나토색소 등이 있다(6,7). 이들 천연색소와 관련한 연구로는 천연색소 추출물의 항균활성(8), 항산화활성(9,10), 항비만활성(11) 및 천연색소의 안정성(12,13)에 관한 연구들이 진행된 바 있다. 이들 천연색소들은 천연소재로부터 얻어진다는 점을 고려할 때 단순 색소로서의 역할 뿐만 아니라 다양한 기능성을 지닌 생리활성 물질로서도 기능을 발휘할 것으로 추정

*Corresponding author. E-mail : whanbee@hanmail.net
Phone : 82-55-860-8947, Fax : 82-55-860-8960
Received 21 July 2015; Revised 9 December 2015; Accepted 11 December 2015.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

된다. 그러나 아직까지 다양한 천연색소 소재와 관련된 연구는 아직 미흡한 실정이며, 생리활성을 규명하기 위한 연구는 지속적으로 추진되어야 할 것이다.

이러한 차원에서 본 연구진은 천연색소 자원들을 소재로 하여 이들의 항산화, 소화효소 억제 활성 및 항비만 활성 연구를 추진한 바 있으며(11,14) 선행연구를 통해 항산화 활성 및 항비만 활성이 상대적으로 우수한 천연색소 소재 7종을 선별하였다. 이들 소재 중 아선약(catechu, *Uncaria gambir Roxburgh*)은 국내에서는 영, 정조 이후부터 흑색을 물들이는 원료로 궁중에서 주로 사용하여 왔으며, 자외선, 산소, 효소 등에 의해 발색이 되는 특성이 있어 염색직물의 변퇴 우려가 없는 천연염재로 각광을 받고 있고(15), 항균활성이 우수하며, 폴리페놀 성분들이 해독작용, 혈중 콜레스테롤 저하 및 항암 활성을 지니는 것으로 알려져 있다(14). 오배자(gallnut, *Aphis chinensis*)는 울나무과에 속한 낙엽소교목인 붉나무 또는 그 밖의 동속 식물의 잎에 오배자 진딧물의 자상에 의하여 생긴 벌레집으로 주요 성분은 pyrogallol tannin이며, 항균작용 및 항산화, 항혈전, 간보호 등 약리작용과 미백 및 항 주름 효과를 지닌다(16,17). 정향(clove, *Syzygium aromaticum*)은 서구문화의 급속한 유입으로 인한 식생활의 변화로 그 사용이 계속 증가하고 있는 향신료의 일종으로 추출물은 항산화(3), 항균(18), 항바이러스(19), 항스트레스(20) 등 여러 생리작용을 지니고 있으며, 식품, 약품, 방부제 등에 쓰이거나, 발작증을 비롯하여 치과에서 진통제 등으로도 사용되고 있다(3).

이렇듯 여러 방면에서 뛰어난 생리활성을 나타내는 천연소재들과 관련하여 개개의 성분에 대한 연구는 일부 추진되어 있으나, 이들로부터 분리한 색소 성분 및 복합물의 생리활성을 규명하기 위한 연구는 아직 부족한 실정이므로 본 연구에서는 개별 천연색소 성분들과 이들을 혼합한 복합물의 생리활성 검증을 통해 혼합 사용시 활성의 변화 정도를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

아카시아(*Acacia, Robinia pseudoacacia* L.), 코치닐(*Cochineal, Dactylopius coccus costa*), 아선약, 포도(*Grape, Vitis vinifera* L.)과피, 감(*Persimmon, Diospyros kaki*), 오배자 및 정향으로부터 색소 성분을 추출 분리하여 사용하였다. 추출물을 제조하기 위하여 각각의 건조 시료 1 kg에 10 L의 물을 가한 후 catalase(Biotouch®CAT200, AB Enzymes, Rajamäki, Finland) 및 alcalase(Alcalase®, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 1% 농도로 첨가하고 45°C에서 10시간 동안 반응시킨 다음 80°C로 조절된 추출기(Cosmos 660, Kyungseo, Incheon, Korea)를 이용하여 2시간

동안 추출하였다. 그 후 추출물을 여과하여 농축기(rotavapor R-220, BUCHI, Flawil, Switzerland)로 농축한 다음 분무건조기(B-290, BUCHI, Flawil, Switzerland)를 이용하여 분말화해 실험용 시료로 사용하였다.

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) 라디칼 소거활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성은 Re 등(21)의 방법에 따라 7 mM의 ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시킨 후 증류수를 가하여 415 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 조정하여 사용하였다. ABTS 용액에 동량의 시료액을 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois(22)의 방법에 따라 DPPH에 대한 전자공여 활성으로 나타내었다. 즉, 에탄올에 5 mg/100 mL의 농도로 용해한 DPPH 용액을 동량으로 혼합하여 충분히 교반한 다음 상온에서 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각각의 라디칼 소거활성은 시료 무첨가군에 대한 시료 첨가군의 비로부터 산출하여 %로 표시하였다.

콜레스테롤 흡착활성 측정

천연색소 추출물 및 혼합물의 콜레스테롤 흡착활성은 Soh 등(23)의 방법을 응용하여 kit시약(AM 202-k, Asan Pharm., Seoul, Korea)으로 측정하였다. 시료액 1 mL에 콜레스테롤(300 mg/dL) 50 µL를 가하여 25°C에서 20분간 반응시킨 후 0.1 M hexadecyl-trimethylammonium bromide (Sigma Co., St Louis, MO, USA) 50 µL를 첨가하여 25,000×g에서 15분간 원심분리 시켰다. 상층액 200 µL를 취하여 효소액 1.5 mL을 가해 혼합한 후 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 무첨가군에 대한 시료 첨가군의 흡광도 비로써 콜레스테롤 흡착활성(%)을 나타내었다.

COX-2(cyclo oxygenase-2) 저해활성 측정

COX-2 저해활성은 COX inhibitor screening assay kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 측정하였다. 1.5 mL 튜브에 시료 20 µL를 첨가한 후 30 units/mL 농도의 COX-2 효소용액 10 µL, heme 용액(150 µM/mL) 10 µL 및 반응 완충액(0.1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM phenol, pH 8.0) 950 µL를 가하여 혼합한 후 37°C에서 5분간 안정화시켰다. 여기에 기질인 아라키돈산 용액(10 mM)을 10 µL 넣고 37°C에서 2분간 반응시킨 후 1 M의 HCl 50 µL를 넣고 반응을 정지시켰다. 생성된 prostaglandin

H₂ (PGH₂)를 prostaglandin F_{2α}(PGF_{2α})로 전환하기 위하여 SnCl₂ 용액(50 mg/mL) 100 μL를 첨가하여 교반한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 그 후 생성된 PGF_{2α}를 정량하기 위하여 경쟁적 효소면역반응(EIA, enzyme immunoassay) 완충액(0.1 M phosphate, 0.1% BSA, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% sodium azide)으로 2,000배 희석하고 이를 프로스타글란딘 항체가 코팅된 96 well plate에 50 μL씩 분주 후 PGs screening AChE tracer 50 μL와 antiserum을 50 μL씩 첨가한 후 18시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 반응을 완료하고 완충액으로 5회 세척한 후 Ellman's reagent를 200 μL씩 넣고 90분간 발색시킨 다음 ELISA reader(Epoch, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. COX-2 저해활성(%)은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 평균±표준편차로 나타내었다.

α-Amylase 저해활성 측정

Pancreatin 기원의 α-amylase 저해활성은 Choi 등(24)의 방법을 변형하여 시료액 75 μL에 1% starch 75 μL를 가하여

37°C에서 10분간 반응시킨 후 1 unit/mL의 α-amylase 효소액을 150 μL 가하여 다시 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 48 mM의 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid, 30% potassium sodium tartrate in 0.5 M NaOH) 발색시약 300 μL를 넣고 100°C에서 15분간 끓여 반응을 중지시킨 후 냉각하고 증류수 1.2 mL를 가하여 희석시켰다. 양성 대조군으로는 농도별로 희석한 acarbose를 사용하여 동일하게 실험하였다. 반응액은 540 nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교해 저해율(%)을 계산하였다.

α-Glucosidase 저해활성 측정

α-Glucosidase 저해활성은 0.1 M phosphate 완충용액(pH 6.8)에 용해한 2.5 mM의 p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside 50 μL와 0.2 unit/mL의 α-glucosidase 50 μL 및 농도별 시료액 50 μL를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 0.1 M NaOH 100 μL로 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(25). α-Glucosidase 저해활성은 효소액을 첨가하지 않은 실험구의 흡광도 및 시료 무첨가구의 흡광도를 각각 측정하여 그 비로부터 저해활성을 산출하였으며, 이

Table 1. ABTS radical scavenging activity of natural color powder and mixtures

(%)

Sample name	Concentration (μg/mL)	Acacia	Cochineal	Catechu	Grape peel	Persimmon	Gallnut	Clove
Acacia	31.25	62.66±1.00 ¹⁾						
	62.5	93.70±0.47						
	125	98.15±0.11						
Cochineal	31.25	35.68±0.89	11.30±0.64					
	62.5	64.73±0.76	23.36±0.31					
	125	95.01±0.36	35.94±1.04					
Catechu	31.25	83.11±0.55	69.44±0.63	94.57±0.28				
	62.5	96.38±0.03	95.17±0.27	96.71±0.01				
	125	97.25±0.03	94.11±0.48	97.49±0.02				
Grape peel	31.25	40.95±0.19	16.90±0.71	70.36±1.17	23.47±0.50			
	62.5	68.69±1.22	31.36±0.30	95.00±0.08	45.40±1.84			
	125	95.35±0.21	54.18±1.59	96.79±0.03	81.37±0.26			
Persimmon	31.25	39.89±0.35	13.74±0.31	73.38±1.48	22.21±1.45	21.45±0.65		
	62.5	73.62±0.96	28.34±0.27	95.78±0.09	43.74±0.50	42.57±0.59		
	125	97.62±0.08	51.02±0.77	97.26±0.02	78.64±1.41	80.18±0.91		
Gallnut	31.25	84.15±0.50	73.61±0.44	93.41±0.52	74.88±0.30	74.73±0.48	94.55±0.08	
	62.5	96.45±0.07	95.89±0.15	96.37±0.07	95.11±0.05	95.88±0.04	96.18±0.03	
	125	96.76±0.02	99.22±0.39	96.72±0.06	96.46±0.08	97.04±0.01	96.43±0.04	
Clove	31.25	73.16±0.38	51.89±1.17	92.71±0.21	53.56±1.26	57.28±0.89	92.67±0.54	86.85±0.70
	62.5	97.46±0.05	86.81±1.12	97.21±0.03	91.13±0.81	95.51±1.74	97.39±0.09	97.97±0.13
	125	98.05±0.05	98.09±0.28	97.62±0.05	98.10±0.08	98.21±0.03	97.34±0.01	97.35±0.06

¹⁾Each value represents mean±SD (n=3).

때 양성대조군으로 acarbose를 사용하였다.

통계처리

각 실험은 3회 반복 실험한 결과에 대하여 SPSS(14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계처리 하였으며, 각각의 시료에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료군에 대한 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

천연색소 7종 및 색소간 혼합물의 항산화활성

항산화물질들은 지질 자동 산화에 있어 연쇄반응 개시의 방지, 전이금속 이온과의 결합, 과산화물의 분해와 같은 다양한 방법으로 작용하여 활성을 나타내므로(26) 그 작용 기작에 따라 활성을 평가하는 방법 또한 다양하다. 대표적인 항산화활성 평가법으로 활용되고 있는 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성은 시약의 탈색 정도를 통해 라디칼의 소거 활성을 평가한다는 점은 동일하지만 ABTS법은 양이온을

소거하고, DPPH법은 유리라디칼을 소거한다는 점에서 서로 차이를 가진다(27).

천연 유래 색소 7종을 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 및 125 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 제조한 후 개별 시료와 이들의 1:1 혼합물의 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과는 각각 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

시료의 ABTS 라디칼 소거활성은 농도와 비례하여 증가하는 경향이었으며, 7종의 색소 시료 중 아선약, 오배자, 정향이 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 85% 이상으로 여타 시료에 비해 활성이 높았다. 아선약, 오배자 및 정향을 각각 1:1로 혼합한 아선약+오배자, 아선약+정향, 오배자+정향의 ABTS 라디칼 소거활성은 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 90% 이상으로 높았다. 시료들을 서로 혼합함으로써 ABTS 라디칼 소거활성은 증가하였는데, 상대적으로 활성이 낮은 시료들끼리 혼합하였을 때는 그 활성의 증가폭이 적지만 활성이 높은 시료와 혼합할 때는 더 큰 폭으로 활성이 증가하였다. 즉, 31.25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 활성이 $11.30 \pm 0.64\%$ 로 낮은 코치닐의 경우 감(21.45±0.65%)과 혼합하였을 때 ABTS 라디칼 소거활성은 $13.74 \pm 0.31\%$ 였으나 아선약과 혼합하였을 때

Table 2. DPPH radical scavenging activity of natural color powder and mixtures

Sample name	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration						
		Acacia	Cochineal	Catechu	Grape peel	Persimmon	Gallnut	Clove
Acacia	31.25	$16.51 \pm 0.14^{1)}$						
	62.5	29.09 ± 0.97						
	125	39.81 ± 1.46						
Cochineal	31.25	8.46 ± 0.97	6.14 ± 0.59					
	62.5	15.11 ± 0.80	8.80 ± 0.37					
	125	21.60 ± 1.21	9.34 ± 0.53					
Catechu	31.25	29.05 ± 0.84	22.67 ± 1.11	39.95 ± 0.79				
	62.5	50.49 ± 1.84	44.34 ± 1.36	64.04 ± 1.51				
	125	68.32 ± 0.82	66.49 ± 1.09	78.64 ± 0.90				
Grape peel	31.25	14.26 ± 1.05	7.83 ± 0.33	25.03 ± 0.20	11.80 ± 0.43			
	62.5	27.35 ± 0.76	13.83 ± 0.22	43.39 ± 0.89	19.21 ± 0.43			
	125	45.24 ± 1.33	23.39 ± 0.65	56.58 ± 0.80	30.83 ± 0.31			
Persimmon	31.25	7.05 ± 0.53	5.45 ± 0.26	26.74 ± 0.51	10.08 ± 0.33	8.41 ± 0.48		
	62.5	20.42 ± 0.56	12.95 ± 0.33	42.45 ± 2.06	16.86 ± 0.21	18.11 ± 0.45		
	125	36.86 ± 1.36	23.52 ± 0.07	65.94 ± 0.14	28.88 ± 0.97	31.13 ± 0.99		
Gallnut	31.25	29.31 ± 1.27	23.33 ± 0.16	38.91 ± 1.06	24.97 ± 0.70	25.28 ± 0.63	39.68 ± 0.58	
	62.5	52.00 ± 1.94	41.84 ± 0.99	62.01 ± 0.83	43.39 ± 0.26	46.06 ± 1.29	65.52 ± 1.13	
	125	66.87 ± 0.91	64.97 ± 1.04	78.43 ± 0.69	59.23 ± 0.86	67.56 ± 1.98	77.70 ± 0.26	
Clove	31.25	33.93 ± 0.71	29.34 ± 0.73	36.94 ± 1.00	23.66 ± 0.64	23.51 ± 1.02	33.59 ± 1.10	34.94 ± 0.89
	62.5	48.45 ± 1.47	42.49 ± 0.71	59.94 ± 0.61	39.93 ± 0.99	42.63 ± 1.33	59.11 ± 1.20	61.60 ± 1.40
	125	65.43 ± 0.67	60.56 ± 0.85	78.20 ± 1.47	61.90 ± 1.88	65.73 ± 0.67	78.06 ± 1.22	79.62 ± 0.66

¹⁾Each value represents mean±SD (n=3).

는 $69.44 \pm 0.63\%$ 로 월등히 활성이 증가하여 혼합되는 시료에 따라 활성이 영향을 받을 수 있었다.

DPPH 라디칼 소거활성은, 최고농도인 $125 \mu\text{g/mL}$ 농도에서도 $9.34 \pm 0.53 \sim 79.62 \pm 0.66\%$ 로 그 절대값은 ABTS 라디칼 소거활성보다는 낮았으나, 아선약, 오배자, 정향 및 이들의 1:1 혼합물의 라디칼 소거활성이 여타시료에 비해 높아 ABTS 라디칼 소거활성과 같은 경향이었고, 시료의 농도와 활성은 양의 상관관계를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 본 연구에 사용된 천연색소 시료들은 유리 라디칼보다는 양이온 라디칼의 소거에 더 효과적인 것으로 판단된다. 아선약의 DPPH 라디칼 소거활성은 $125 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 $78.64 \pm 0.90\%$ 였는데, 활성이 유사한 범위인 오배자 ($77.70 \pm 0.26\%$)와 혼합하였을 때는 $78.43 \pm 0.69\%$ 로 활성이 증가하지 않아 서로 활성의 증가에 대한 상승효과가 없었으나 활성이 낮은 코치닐($9.34 \pm 0.53\%$)과 혼합함으로써 혼합물의 활성은 코치닐 단독 사용시에 비해 약 7.1배 증가하였다.

Boo 등(1)은 식물유래 천연색소인 적양배추, 양파껍질, 포도과피, 오디 색소 등은 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 지니는데, 이들 식물성 천연색소는 일종의 페놀성 물질이므로 페놀성 화합물의 강한 환원력으로 인해 전자를 공여하고 산화를 억제하여 우수한 항산화능을 나타내는 것으로 보고하였다(28). 본 연구에서 색소분말들이 높은 라디칼 소거활성을 가지는 것도 페놀성 화합물의 영향인 것으로 추정된다.

아선약에 함유되어 있는 주요 항산화성 물질로는 콜레스테롤 저하, 해독작용, 혈당강화 기능이 있는 epicatechin이 있으며(29), 정향은 대표적인 항산화성 물질로 eugenol이 알려져 있으나 eugenol이 함유되어 있지 않은 극성 용매 추출물도 항산화활성이 높아 eugenol외에도 극성용매에서 용출이 용이한 페놀성 물질의 함량이 높은 것으로 추정되고 있다(30). 오배자로부터 syringic acid, gallic acid methylester, protocatechuic acid, gallic acid 및 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose를 분리하여, 항산화활성을 분석한 Cha 등(16)은 이들 물질은 tocopherol보다는 우수하고, BHT와는 유사 또는 더 우수한 항산화효과를 나타내는 오배자의 주요 항산화 활성물질이라고 보고한 바 있다.

천연색소 7종과 혼합물의 콜레스테롤 흡착 및 COX-2 저해활성

천연색소 7종에 대하여 *in vitro*상에서 혈행개선 효과를 검증하기 위하여 1 mg/mL 의 농도에서 콜레스테롤 흡착활성과 COX-2 저해활성을 평가한 결과와 천연색소 분말 7종 중 항산화활성, 콜레스테롤 흡착활성 및 COX-2 저해활성 측정 결과를 고려하여 그 활성이 우수하였던 아선약, 오배자, 정향을 선별하여 이들을 동량으로 혼합한 아선약+오배자, 아선약+정향, 오배자+정향, 아선약+오배자+정향 혼합

물을 제조하여 콜레스테롤 흡착활성 및 COX-2 저해활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다.

시료 7종의 콜레스테롤 흡착활성은 $13.19 \pm 1.50 \sim 82.40 \pm 0.95\%$ 의 범위였는데, 정향의 활성이 가장 높았고, 다음으로 아선약($66.71 \pm 0.21\%$), 아카시아($64.44 \pm 1.65\%$), 오배자($54.62 \pm 0.75\%$)의 순으로 활성이 높았다. 반면 코치닐의 콜레스테롤 흡착활성은 가장 낮았다. 혼합물의 콜레스테롤 흡착활성은 아선약+정향($76.65 \pm 0.36\%$)과 오배자+정향($75.81 \pm 0.55\%$) 혼합물이 75% 이상의 높은 활성을 나타내었으며, 다음으로 세 가지 시료를 모두 혼합한 혼합물의 활성은 $71.98 \pm 0.95\%$ 로 활성이 높았다. 하지만 아선약과 오배자를 동량으로 혼합한 시료군의 활성은 $57.85 \pm 1.70\%$ 로 세 가지 색소를 모두 혼합한 시료군 보다 15% 정도 활성이 더 낮았다. 콜레스테롤 흡착 활성이 우수한 정향이 첨가된 혼합물의 활성이 여타 혼합물에 비해 더 높아 정향이 혼합물 중에서 콜레스테롤 흡착활성 강화에 크게 기여하며 혼합물의 조성 조건에 따라서는 활성이 상이함을 알 수 있었다. 따라서 시료 단독으로 보다는 이들을 적절히 혼합하여 활용할 경우 생체 내 항산화, 혈행개선 등의 생리활성에서 시너지 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. Lee 등(31)은 홍마늘 추출물과 혼합물 2.5 mg/mL 에 대한 콜레스테롤에 대한 흡착활성을 측정한 결과, 홍마늘 추출물의 활성은 3.85%로 낮았으나 녹차와의 혼합물은 36.54%로 활성이 9.5배 증가하였고, 녹차와 식이섬유를 동시에 혼합한 혼합물의 활성은 44.23%로 11.5배 더 높아 단일 시료에 비해 혼합물의 활성이 증가한다고 보고한 바 있는데 이는 본 연구의 결과와 동일한 경향이였다.

Table 3. Cholesterol adsorption and COX-2 inhibitory activities for seven kinds of natural color powder and mixtures of catechu, gallnut, and clove from natural color

Sample name ¹⁾	Cholesterol adsorption activity (%)	COX-2 inhibitory activity (%)
Acacia	$64.44 \pm 1.65^{\text{FZ}}$	$41.73 \pm 3.39^{\text{A}}$
Cochineal	$13.19 \pm 1.50^{\text{A}}$	$51.03 \pm 7.76^{\text{BC}}$
Catechu	$66.71 \pm 0.21^{\text{G}}$	$49.73 \pm 2.68^{\text{B}}$
Grape peel	$50.43 \pm 0.72^{\text{C}}$	$51.56 \pm 6.04^{\text{BC}}$
Persimmon	$38.81 \pm 1.10^{\text{B}}$	$55.95 \pm 4.55^{\text{BCD}}$
Gallnut	$54.62 \pm 0.75^{\text{D}}$	$57.45 \pm 2.38^{\text{CD}}$
Clove	$82.40 \pm 0.95^{\text{I}}$	$56.72 \pm 3.47^{\text{CD}}$
Catechu+gallnut	$57.85 \pm 1.70^{\text{E}}$	$58.63 \pm 3.11^{\text{D}}$
Catechu+clove	$76.65 \pm 0.36^{\text{I}}$	$61.19 \pm 1.18^{\text{D}}$
Gallnut+clove	$75.81 \pm 0.55^{\text{I}}$	$59.57 \pm 2.52^{\text{D}}$
Catechu+gallnut+clove	$71.98 \pm 0.95^{\text{H}}$	$62.25 \pm 2.74^{\text{D}}$

¹⁾Treated sample concentration was 1 mg/mL .

²⁾Each value represents mean \pm SD (n=3). Means with different superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$.

COX-2는 대식세포와 같은 염증세포의 활성화로 유도되며, 염증과 알레르기 반응을 매개하는 프로스타글란딘을 형성하는데, COX-2의 발현 억제는 혈전에 의해 형성된 혈관의 염증 가속화를 억제하며, 동맥경화의 진행 및 죽상판의 확대를 방지함으로써 혈액순환 장애를 개선하는 효과를 나타낸다(7,32). 본 연구에 사용된 천연색소 분말 7종을 1 mg/mL 농도로 제조하여 COX-2 저해활성을 측정된 결과 (Table 3) 아카시아 분말의 활성이 가장 낮아 41.73±3.39%였고, 여타 시료들의 활성은 49.73±2.68~57.45±2.38%로, 이들 시료간에 유의적인 차이는 없었다. 아선약, 오배자, 정향 혼합물 4종에 대한 COX-2 저해활성은 58.63±3.11~62.25±2.74%의 범위였으며, 이들 혼합물간의 활성은 통계적인 유의차가 없었다. 하지만 천연색소 혼합물의 COX-2 저해활성은 시료 단독의 활성에 비해 활성이 더 우수하여, 와송과 한약재 복합물의 *in vitro* 생리활성 평가를 통해 한약재의 유효 성분은 식품 중의 다른 성분과 공존할 경우 시너지 효과를 나타내어 생체 방어 시스템의 보강 및 생체 내 항상성 유지에도 유효한 것으로 추정된 Lee 등(33)의 연구 결과와 동일한 경향이였다.

아선약, 오배자, 정향 및 이들 복합물의 α -amylase 저해활성

탄수화물의 α -D-(1,4)-glucan 결합을 분해하는 효소인 α -amylase는(26) 사람을 비롯하여 동물, 미생물 등의 탄수화물 대사에 필수적인 효소이지만, 이를 저해시킴으로써 탄수화물의 소화속도를 지연시켜 식후 혈당 상승을 억제하거나 에너지 생성량을 감소시킬 수 있다(34). 이러한 관점에서 최근 에너지 영양소의 소화 및 흡수를 저해하거나, 식욕을 저해하는 기전에 의해 체중 조절 의약품을 개발하거나 이러한 활성을 이용해 당뇨 치료 물질들을 개발함에 있어 α -amylase 저해 활성이 있는 천연물질의 탐색은 건강기능식품의 경쟁력을 확보할 수 있는 방안으로 인지되고 있다 (35,36).

아선약, 오배자, 정향과 이들의 혼합물을 31.25 μ g/mL, 62.5 μ g/mL에서 α -amylase 저해활성을 측정된 결과(Table 4), 양성 대조군인 acarbose의 활성은 15.625 μ g/mL의 농도에서도 43.14±2.18%로 우수하였으나 천연색소 분말 및 이들의 복합물의 활성은 2배 높은 농도에서도 25% 이하였다. 모든 시료가 첨가 농도를 62.5 μ g/mL로 하였을 때보다 더 낮은 농도인 31.25 μ g/mL에서 활성이 더 높아 시료의 첨가 농도와 활성이 비례관계에 있지 않았다. 또한 혼합물 4종의 α -amylase 저해활성은 단일물의 활성보다 오히려 더 낮아 31.25 μ g/mL 농도에서 2종류의 색소 분말을 혼합한 혼합물의 활성은 19.22±0.70~20.04±2.32%였으나 3종을 모두 혼합하였을 때 활성은 17.63±1.76%였고, 62.5 μ g/mL 농도에서는 16.99±0.95%로 활성이 더 낮았다.

Kwon 등(37)은 화살나무 잎의 열수 추출물은 0.001~0.1 mg/mL 농도에서 21~22%의 α -amylase 저해활성을 가진다

고 보고한 바 있고, 전통 의학에서 당뇨 처방에 사용되는 한약재 6종의 혼합물은 1 mg/mL 농도에서 31.5%, 10 mg/mL의 농도에서 38.4%의 α -amylase 저해활성을 가진다는 보고(36)로 미루어 볼 때 본 연구 결과에서와 유사하게 α -amylase 저해활성은 시료의 농도에 비례하여 증가하지는 않는 것으로 생각된다.

Table 4. α -Amylase inhibitory activity of catechu, gallnut, clove, and mixtures

Sample	Sample concentration (μ g/mL)		Acarbose ³⁾ concentration	
	31.25	62.5	15.625	125
Catechu	23.13±0.24 ^{CD1)}	22.31±2.73 ^B		
Gallnut	25.49±2.45 ^D	21.99±2.11 ^B		
Clove	22.44±0.59 ^{BC}	19.67±0.08 ^{AB²⁾}		
Catechu+gallnut	20.04±2.32 ^{AB}	18.49±0.85 ^A		
Catechu+clove	19.22±0.70 ^A	18.31±1.85 ^A		
Gallnut+clove	19.72±1.09 ^{AB}	16.77±1.77 ^A		
Catechu+gallnut+clove	17.63±1.76 ^A	16.99±0.95 ^A		
			43.14±2.18	69.83±1.21

¹⁾Each value represents mean±SD (n=3). Means with different superscript in the same column are significantly different at p<0.05.

²⁾Means with superscript (*) in the same sample are significantly different at p<0.01.

³⁾Positive control.

아선약, 오배자, 정향 및 이들 혼합물의 α -glucosidase 저해활성

천연식물 유래 색소 추출물 중 항산화활성, 콜레스테롤 흡착능 및 COX-2 저해활성이 우수하였던 시료 3종(아선약, 오배자, 정향)을 선별하여 각각의 α -glucosidase 저해활성과 이들 혼합물 4종(아선약+오배자, 아선약+정향, 오배자+정향, 아선약+오배자+정향)의 α -glucosidase 저해활성을 측정하였다(Table 5). 시료의 농도가 높을수록 α -glucosidase 저해활성도 증가하였으며, 31.25 μ g/mL 농도에서도 모든 시료의 활성은 65% 이상으로 양성 대조군으로 이용한 acarbose(57.82±0.48%) 보다 활성이 더 높았다. 단일 시료군 중 아선약의 α -glucosidase 저해활성이 가장 우수하였으며, 아선약이 첨가된 혼합물도 70% 이상의 높은 저해활성을 나타내었다. 하지만 단일 시료 중 가장 활성이 낮은 정향이 첨가된 혼합물은 여타 시료에 비해 그 활성이 더 낮았다.

α -Glucosidase 저해제는 소장의 brush border에 존재하는 이당류 분해효소를 가역적으로 억제하여 탄수화물 흡수를 지연시킴으로써 식후 혈당을 감소시키고 제2형 당뇨의 고혈당으로 인한 인슐린 분비 지연을 개선시키는데 효과적인 것으로 알려져 있다(24,38). 당뇨의 치료를 위해서 인슐린 분비 촉진제, 간에서의 포도당 신생합성 억제제, 인슐린 감작제, 소화관에서 포도당 흡수 지연에 관여하는 α

-glucosidase 저해제가 경구 혈당 강화제로 사용되고 있는데, α -glucosidase 저해제 중의 하나인 acarbose는 장기 복용 시 복부팽만감, 구토, 설사와 같은 부작용이 유발되기도 하므로(32,36), 천연에서 α -glucosidase 저해활성이 우수한 소재와 발굴은 지속적인 연구를 요하고 있는데, 본 연구에서 선발된 아선약, 오배자, 정향 및 이들의 혼합물은 모두 동일 농도의 acarbose에 비해 높은 α -glucosidase 저해 활성을 나타내므로 좋은 항당뇨 활성 소재로서 충분히 그 가치가 있을 것으로 사료된다.

Table 5. α -Glucosidase inhibitory activity of catechu, gallnut, clove, and mixtures

Sample	Sample concentration (μ g/mL)		
	31.25	62.5	125
Catechu	72.84 \pm 1.13 ^{ab1)}	83.49 \pm 0.88 ^{bf}	91.36 \pm 0.22 ^{ef}
Gallnut	67.03 \pm 1.76 ^{aA}	80.01 \pm 0.96 ^{bd}	91.05 \pm 0.18 ^{ef}
Clove	66.56 \pm 0.91 ^{aA}	68.27 \pm 0.72 ^{aA}	72.66 \pm 1.02 ^{ba}
Catechu+gallnut	71.93 \pm 1.59 ^{ab}	81.72 \pm 0.89 ^{be}	91.65 \pm 0.56 ^{ef}
Catechu+clove	70.29 \pm 1.23 ^{ab}	75.94 \pm 0.55 ^{bc}	87.00 \pm 0.77 ^c
Gallnut+clove	65.95 \pm 2.00 ^{aA}	70.98 \pm 1.52 ^{bb}	84.54 \pm 0.54 ^{cb}
Catechu+gallnut+clove	70.98 \pm 0.96 ^{ab}	78.93 \pm 0.72 ^{bd}	89.54 \pm 0.20 ^{cd}
Acarbose ²⁾	57.82 \pm 0.48 ^a	59.25 \pm 0.44 ^b	60.22 \pm 0.48 ^c

¹⁾Each value represents mean \pm SD (n=3). Means with different superscript (a-c) in the same row are significantly different at p<0.05. Means with different superscript (A-F) in the same column are significantly different at p<0.05.

²⁾Positive control.

요 약

천연색소 혼합물의 생리활성을 검증하고자 하고자 천연색소 7종에 대하여 ABTS 라디칼 소거활성과 DPPH 라디칼 소거활성, 콜레스테롤 흡착활성 및 COX-2 저해활성을 측정하였으며, 활성이 우수하였던 시료 3종(아선약, 오배자, 정향)을 선별하였다. 선정된 3종 시료의 혼합물 4종(아선약+오배자, 아선약+정향, 오배자+정향, 아선약+오배자+정향)에 대해서는 콜레스테롤 흡착활성, COX-2 저해활성, α -glucosidase 및 α -amylase 저해활성을 측정하였다. 천연색소 시료들은 DPPH 라디칼 소거활성에 비해 ABTS 라디칼 소거활성이 더 우수하였으며, 콜레스테롤 흡착활성은 정향이 유의적으로 높았고, COX-2 저해활성은 아카시아 분말이 유의적으로 낮았으며, 여타 시료간에는 유의적인 활성의 차이가 없었다. α -Amylase 저해활성은 아선약과 오배자에서 높았으나, 혼합물들에서는 서로간에 유의적인 차이가 없었다. α -Glucosidase 저해활성은 아선약 분말이 가장 높았고, 아선약이 첨가된 혼합물의 활성이 더 높았다. 이상의

결과를 종합하여 볼 때 천연색소의 생리활성은 혼합물로 조성하여 활용할 때 시너지 효과를 얻을 수 있으나, 조합되는 물질간의 상호작용에 따라 활성의 증감 정도는 상이하므로 이에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 산업통상자원부 지역특화기술융복합연구지원사업(과제번호:R0002039) 성과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

References

1. Boo HO, Hwang SJ, Bae CS, Park SH, Song WS (2011) Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. Korean J Plant Res, 24, 105-112
2. Boo HO, Shin JS, Hwang SJ, Bae CS, Park SH (2012) Antimicrobial effects and antioxidative activities of the cosmetic composition having natural plant pigments. Korean J Plant Res, 25, 80-88
3. Dong S, Jung SH, Moon JS, Rhee SK, Son JY (2004) Antioxidant activities of clove by extraction solvent. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 609-613
4. Shin HJ (2007) A trend in research and development of natural gardenia pigments. Korean Soc Biotechnol Bioeng J, 22, 271-277
5. Nodai A, Machida T, Izumi S, Hamaya Y, Kohno T, Igarashi Y, Iizuka K, Minami M, Hirafuji M (2007) Sphingosine 1-phosphate induces cyclooxygenase-2 via Ca²⁺-dependent, but MAPK-independent mechanism in rat vascular smooth muscle cells. Life Sci, 80, 1768-1776
6. Park SE (2004) A barrier of the pigment industry in food using coloring agents (I). The Monthly Food Indu, 22, 65-83
7. Park SE (2004) A barrier of the pigment industry in food using coloring agents (II). The Monthly Food Indu, 22, 75-95
8. Han SY, Choi SY (2000) Antibacterial characteristics of the extracts of yellow natural dyes. J Korean Soc Dyers Finish, 12, 43-50
9. Kim YS, Suh HJ, Park S (2015) Antioxidant activity of hot-water extracts and floral waters from natural plant pigments. Korean J Food Preserv, 22, 129-133
10. Shin IS, Hwang SJ, Kim SO, Heo D, Kim ME (2011)

- Antioxidative activity of mixture of *schisandrae fructus* (SF) and *perilae folium* (PF) using natural color fixation technic. Korean J Herbology, 26, 37-45
11. Hwang CR, Kang MJ, Shim HJ, Suh HJ, Kwon OW, Shin JH (2015) Antioxidant and antiobesity activities of various color resources extracted from natural plants. J Korean Soc Food Sci Nutr, 44, 165-172
 12. Bae DG, Lee SE (2010) Colorant extracting and its storage stability from sorghum. Agric Rex Bull Kyungpook National University, 28, 9-15
 13. Woo DH (2000) Stabilization to sunlight of natural coloring matter by soluble methyl-hesoeridin. Korean J Food Sci Technol, 32, 50-55
 14. Hwang CR, Tak HM, Kang MJ, Suh HJ, Kwon OW, Shin JH (2014) Antioxidant and antiobesity activity of natural color resources. J Life Sci, 24, 633-641
 15. Nam KY, Lee JS (2011) Effect of UV irradiation on the color and mechanical properties of catechu dyed fabrics. Korean J Human Ecology, 20, 1009-1023
 16. Cha BC, Lee SB, Rhim TJ, Lee KH (2000) Antioxidative and hepatoprotective effect of compounds isolated from *Galla rhois* (*Rhus javanica* Linne). Korean J Medicinal Crop Sci, 8, 157-164
 17. Cho HS, Kang SW, Kim JH, Choi MJ, Park E, Chun HS (2014) Antioxidant and antimicrobial activities of combined extracts of *Galla rhois*, *Achyranthes japonica nakai*, *Terminalia chebula Retz*, and *Glycyrrhiza uralensis*. Korean Soc Biotechnol Bioeng J, 29, 29-3
 18. Lee OH, Jung SH, Son JY (2004) Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 494-499
 19. Kang SY, Kim TG, Park MS, Han HM, Jung KK, Kang JH, Moon AR, Kim SH (1999) Inhibitory effects of *Eugenia caryophyllate*, *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the replication of HBV in HepG2 cells. J Appl Pharmacol, 7, 133-137
 20. Singh AK, Dhamanigi SS, Asad M (2009) Anti-stress activity of hydroalcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). Indian J Pharmacol, 41, 28-31
 21. Re R, Pellegrini N, 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
 22. Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200
 23. Soh HS, Kim CS, Lee SP (2003) A new in vitro assay of cholesterol adsorption by food and microbial polysaccharides. J Med Food, 6, 225-230
 24. Choi HJ, Jeong YK, Kang DW, Joo WH (2008) Inhibitory effects of four solvent fractions of *Alnus firma* on α -amylase and α -glucosidase. J Life Sci, 18, 1005-1010
 25. Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH, Chung MJ (2008) A study on the glucose regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 542-547
 26. Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, Lee SC (2008) Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. J Korean Soc Sci Nutr, 37, 405-409
 27. Hwang CR, Shin JH, Kang MJ, Lee SJ, Sung NJ (2012) Antioxidant and antiobesity activity of solvent fractions from red garlic. J Life Sci, 22, 950-957
 28. Sanchez CS, Gozalez AMT, Garcia-parrilla MC, Granados JJQ, Serrana HLG, Martinez MCL (2007) Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. Anal Chim Acta, 593, 103-107
 29. Nam KY, Lee JS (2010) Dyeability and functionality of a catechu (Part I) - Characteristics of catechu and dyeing properties of cotton. Korean J Human Ecology, 19, 699-707
 30. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW (2011) Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). J Korean Soc Sci Nutr, 40, 1361-1370
 31. Lee SJ, Hwang CR, Kang JR, Shin JH, Kang MJ, Sung NJ (2012) Anti-obesity effect of red garlic composites in rats fed a high fat-cholesterol diet. J Life Sci, 22, 671-680
 32. Lim CS, Li CY, Kim YM, Lee WY, Rhee HI (2005) The inhibitory effect of *Cornus walteri* extract against α -amylase. J Korean Soc Appl Biol Chem, 48, 103-108
 33. Lee SJ, Shin JH, Kang JR, Hwang CR, Sung NJ (2012) In vitro evaluation of biological activities of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) and Korean traditional plants mixture. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 295-301
 34. Lee SY, Kim JH, Park JM, Lee IC, Lee JY (2014) Antioxidative activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Smilax China* L. Korean J Food Preserv, 21, 254-263
 35. Kim JH, Kim MU, Cho YJ (2007) Isolation and identification of inhibitory compound from *Cataegi fructus* on α -amylase and α -glucosidase. J Korean Soc Appl Biol Chem, 50, 204-209

36. Kim JO, Lee GD (2011) Hypoglycemic effects of medicinal herb mixture prepared through the traditional antidiabetic prescription. *Korean J Food Preserv*, 18, 923-929
37. Kwon GJ, Choi DS, Wang MH (2007) Biological activities of hot water extracts from *Euonymus alatus* leaf. *Korean J Food Sci Technol*, 39, 569-574
38. Kim HY, Lim SH, Park YH, Ham HJ, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM (2011) Screening of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity with Gangwon- do wild plants extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 308-3150