

옥광(*Castanea crenata*) 밤송이 추출물의 생리활성 효과

이은호 · 홍신협 · 조영제

경북대학교 식품공학부/식품생물산업연구소

Biological Activities of Extracts from Okkwang (*Castanea crenata*) Chestnut Bur

Eun Ho Lee, Shin Hyub Hong, and Young Je Cho

School of Food Science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research Institute,
Kyungpook National University

ABSTRACT The contents of phenolic compounds in water and 40% ethanol extracts from Okkwang (*Castanea crenata*) chestnut bur solid (OCS) were 11.24 $\mu\text{g}/50 \mu\text{g}$ solid and 10.28 $\mu\text{g}/50 \mu\text{g}$ solid, respectively. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical decolorization activities of water and ethanol extracts were 85% and 100% as well as 87% and 86% at a solid content of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The anti-oxidant protection factors (PFs) of water and ethanol extracts at a solid content of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were 1.22 PF and 1.45 PF, respectively. Thiobarbituric acid reactive substance were 83% in water extract and 73% in ethanol extract at a solid content of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The inhibitory activities against xanthine oxidase in water and ethanol extracts were 54% and 43% at a solid content of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The inhibitory activities against α -glucosidase were 95% in water extract and 96% in ethanol extract at a solid content of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tyrosinase inhibitory activity was 27% in ethanol extract at a solid content of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The collagenase and elastase inhibitory activities as anti-wrinkle effect were 93% and 11% in water extract as well as 94% and 56% in ethanol extract at a solid content of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hyaluronidase inhibitory activity as anti-inflammatory effect of water and ethanol extracts were 96% and 52% at a solid content of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The results show that extracts from OCS can be used as a functional resource with antioxidant, anti-gout, carbohydrate degradation inhibitory, whitening, anti-wrinkle, and anti-inflammatory activities.

Key words: biological activities, antioxidant, *Castanea crenata*, Okkwang chestnut bur solid

서 론

국가통계포털에 따르면 우리나라는 중국에 이어 밤 생산 2위 국가로 전 세계 밤 생산량의 7% 가량을 차지하고 있으며, 국내 밤 주요산지는 부여, 공주, 충주, 청양, 하동, 합천 순이다. 2014년 기준 국내 밤 생산량은 약 6만 톤에 달한다. 생산량에 따른 밤송이 발생률은 밤 생산 중량의 25%를 차지하며, 연간 밤송이 발생률은 1만 6천 톤에 이른다. 그러나 지금까지 밤송이 껍질은 적당한 이용방법이 개발되지 않아 대부분이 폐기되어 버려지고 있다.

밤나무(*Castanea crenata*)는 참나무과(Fagaceae) 밤나무속(*Castanea*)에 속하는 낙엽활엽교목으로 세계적으로 10여 종이 분포하고 있는데, 국내에서 밤 수확을 목적으로 재배되고 있는 종은 주로 일본밤/한국밤(*Castanea cren-*

ata), 중국밤(*Castanea mollissima*), 미국밤(*Castanea dentata*), 유럽밤(*Castanea sativa*) 등 4종이 있다. 또한, 해발 700 m 아래의 비교적 따뜻하고 해가 잘 드는 산기슭, 산골짜기, 마을주변 등에 식재한다. 과실은 견과이며 난형 또는 도란형이고 각두는 편구형이며, 외면에 가시가 많고 9~10월에 익는다. 밤나무의 과실을 울(栗), 밤의 속껍질을 울피(栗皮), 잎을 울엽(栗葉), 꽃을 울화(栗花), 종자를 울자(栗子), 밤송이를 울모각(栗毛殼)이라고 한다(1). 특히 밤나무의 열매인 울은 식용으로 널리 애용되고 있을 뿐만 아니라 한방에서는 주름살, 하혈, 지혈, 건위, 보신작용 및 칠독의 해독제의 효능이 있는 것으로 알려져 있다(2). 밤의 울피는 꿀에 개어 바르면 노인의 주름살이 퍼지며 피부를 청결하게 하고 노화를 방지하는 것으로 알려져 있으며, 울설은 근골의 아픔을 치료하고 나력의 독기가 있는 증기에 붙인다는 기록이 있으며, 또한 울모각은 반위, 소갈 및 사혈을 치료하니 달여서 즙을 마시고 또 독기 있는 증기를 치료한다(3).

밤의 탄닌 조성은 주로 gallic acid로 밤에 존재하는 polyphenol 화합물 중 가장 많은 것으로 보고되었다(3). 그 외

Received 7 February 2017; Accepted 2 May 2017

Corresponding author: Young Je Cho, School of Food Science and Biotechnology/Food and Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea
Email: yjcho@knu.ac.kr, Phone: +82-53-950-7755

성분으로 밤의 과육(flesh)에는 ferulic acid, caffeic acid, sinapic acid, *p*-coumaric acid, salicylic acid가 함유되어 있다(4). 밤의 껍질에는 ellagic acid, syringic acid, proto-catechuic acid 등의 phenolic acids가 다량 함유되어 있으며(5), 11.0~12.3%의 축합형 탄닌이 함유되어 있다(6). 밤송이의 탄닌 함량은 12.3~15.3%이고 이중 가수분해형 탄닌이 3.2%, 축합형 탄닌이 2.2% 함유하고 있으며, 유효성분 중 gallic acid는 3.3~3.9%, ellagic acid는 2.8~3.0% 함유되어 있다(7). 지금까지 밤에 대한 연구는 주로 저장, 가공식품 제조, 밤 전분의 제조, 변색방지(8), 밤 속껍질의 폐놀성 화합물에 대한 연구(9), 밤 껍질에 의한 중금속 흡착에 관한 연구(10), 울피에 탄올엑스를 함유하는 기능성 화장품의 약제학적 특성 및 피부생리 개선 효과, 미백제 탐색(11), 밤 열매와 밤 내피, 외피 추출물의 항균 효과(12) 연구가 이루어졌으며, 최근에는 밤껍질과 밤송이로부터 항산화 활성, 밤 과육과 밤껍질의 항혈전 효과(13)의 가능성이 보고되었다.

따라서 오래전부터 식용, 민간용법, 약용으로 다양한 용도로 사용되어 왔던 밤의 부산물인 밤송이(chestnut bur)에 여러 가지 유효성분이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있어 이를 활용하기 위한 방안으로 생리활성 효과를 측정하여 고부가가치의 기능성 소재로서의 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 밤 껍질대기인 밤송이는 충청남도 공주지역에서 재배되고 있는 옥광(Okkwang) 품종의 밤나무로부터 수확한 후 밤송이에 들어있는 생밤과 속껍질 및 이물질을 제거한 다음 45°C dry oven(FO600M, Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

옥광 밤송이 추출물의 제조

생리활성 측정을 위한 추출물의 제조는 물 추출물의 경우 옥광 밤송이 분말 1 g을 증류수 200 mL에 침지하여 추출물이 100 mL가 될 때까지 가열한 후 냉각하여 24시간 동안 교반 추출하였으며, 에탄올 추출물은 예비실험에서 추출 수율이 가장 높았던(data not shown) 40% 에탄올을 사용하여 옥광 밤송이 분말 1 g에 40% 에탄올 100 mL를 첨가하여 4°C의 shaking incubator에서 24시간 동안 교반 추출하였다. 각 추출물은 Whatman No. 1 filter paper(Whatman Inc., Piscataway, NJ, USA)로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator(Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하였고, 동결건조기(FD8518, Ilshinbiobase Co., Dongducheon, Korea)를 사용하여 동결 건조한 옥광 밤송이 고형분(Okkwang chestnut bur solid, OCS)을 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

Total phenolic 정량

Total phenolic 정량은 추출물 1 mL에 95% 에탄올 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 잘 섞어 5분간 방치한 후 Na₂CO₃ 1 mL를 가하여 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하여 mg gallic acid equivalent(GAE mg/g)로 나타내었다(14).

항산화 효과 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼에 대한 소거 활성은 Blois(15)의 방법에 따라 측정하였으며, 전자공여능(%)은 1 - (반응구의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) radical cation decolorization의 측정은 Fellegrini 등(16)의 방법에 따라 측정하였고, 저해율(%)은 1 - (반응구의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다. Antioxidant protection factor(PF)는 Andarwulan과 Shetty(17)의 방법에 따라 측정하였으며, PF는 반응구의 흡광도/대조구의 비로 나타내었다. Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 측정은 Buege와 Aust(18)의 방법에 따라 측정하여 저해율(%)은 1 - (반응구의 TBARS μM/대조구의 TBARS μM)×100으로 나타내었다.

Xanthine oxidase(XOase) 저해 효과 측정

XOase 저해 효과 측정은 Stirpe와 Della Corte(19)의 방법에 따라 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 mL와 시료 0.3 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.3 mL 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키고 종료시약 20% trichloroacetic acid 1 mL를 가한 후 반응액을 원심분리 하여 단백질을 제거하고 생성된 요산(uric acid)을 흡광도 292 nm에서 측정하여, 저해율(%)은 (1 - 시료의 uric acid 함량/대조구의 uric acid 함량)×100으로 계산하였다.

α-Glucosidase 저해 효과 측정

α-Glucosidase 저해 효과 측정은 Tibbot과 Skadsen(20)의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM sodium succinate buffer(pH 6.8)에 *p*-nitrophenol-α-D-glucopyranoside(PNPG)를 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 반응종료시약 5% Na₂CO₃를 첨가하였다. 이때 생성된 *p*-nitrophenol을 흡광도 470 nm에서 측정한 후 표준곡선에 대입하여 양을 환산하고, 저해율(%)은 (1 - 시료의 *p*-nitrophenol 함량/대조구의 *p*-nitrophenol 함량)×100으로 계산하였다.

Tyrosinase 저해 효과 측정

Tyrosinase 저해 효과 측정은 Hearing(21)의 방법에 따라 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; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 mL와 시료 0.2 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.2 mL 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 흡광도 475 nm에서 측정하고, 저해율(%)은 $(1 - \text{시료의 absorbance} / \text{대조구의 absorbance}) \times 100$ 으로 계산하였다.

Collagenase 및 elastase 저해 효과 측정

Collagenase 저해 효과 측정은 Wunsch와 Heidrich(22)의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여 4-phenylazo-benzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 0.2 mg/mL collagenase(Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하였다. 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 다음, ethyl acetate 2 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였고, elastase 저해 효과 측정은 Kraunsoe 등(23)의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 1 mL에 기질액 0.8 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 용액 0.1 mL의 혼합액에 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase(PPE; Sigma-Aldrich Co.) 효소용액 0.1 mL와 시료 0.1 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켜 p-nitroaniline 생성량을 흡광도 410 nm에서 측정하였다. 저해율(%)은 $(1 - \text{시료의 absorbance} / \text{대조구의 absorbance}) \times 100$ 으로 계산하였다.

Hyaluronidase(HAase) 저해 효과 측정

HAase 저해 효과는 Dorfman와 OTT(24)의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 시료 0.5 mL에 20 mM sodium phos-

phate buffer(pH 6.9)에 녹인 HAase(1,000 U/mL) 0.5 mL를 혼합하여 38°C에서 5분간 반응시키고 0.3 M phosphate buffer(pH 5.3)에 녹인 기질(4 mg/mL) 0.5 mL를 넣어 다시 38°C에서 45분간 반응시킨 후 0.04 M acetate buffer(pH 3.75)에 녹인 알부민 용액 5 mL를 첨가한 다음 5분간 방치하고 600 nm에서 투과율을 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수 0.5 mL를 넣어 반응시켰다. 저해율(%)은 $(1 - \text{시료의 투과율} / \text{대조구의 투과율}) \times 100$ 으로 계산하였다.

통계처리

모든 실험은 6회 이상 반복 측정하였고 자료의 통계처리는 SPSS 23 for windows(Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였고 분산분석 Duncan's multiple range test, one-way ANOVA를 실시하여 시료 간의 유의차를 $P < 0.05$ 수준으로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

옥광 고흥분 추출물의 phenolic 함량

천연물 내에 존재하는 생리활성물질은 생물체 내의 생리 현상에 관여하는 물질들로 미량 존재하고, 인체에서 면역 조절, 암 예방 및 치료, 노화 방지, 당뇨병 예방, 만성질환 예방 등 다양한 역할을 하며, 이러한 생리활성물질이 1,000 가지 이상 존재하는 것으로 알려져 있다(25). 식물체의 생리활성물질로 알려져 있는 total phenolic 성분의 함량을 측정 한 결과, Fig. 1A에서와 같이 물과 에탄올 추출물의 고흥분에서 각각 11.24 µg/50 µg solid, 10.28 µg/50 µg solid의 phenolic 함량을 나타내었다. 따라서 옥광 밤송이의 고흥분과 phenolic 성분의 함량이 생리활성 효과에 어떠한 영향을 미치는지 비교를 위해 DPPH 라디칼을 측정 한 결과, Fig. 1B에서와 같이 옥광 밤송이 phenolic(Okkwang chestnut bur phenolic, OCP) 물, 에탄올 추출물에서 각각 84.6, 87.4%의 전자공여능을 나타내었고, OCS 물, 에탄올 추출물에서는 각각 71.8, 70.9%의 전자공여능을 나타내어 OCP와

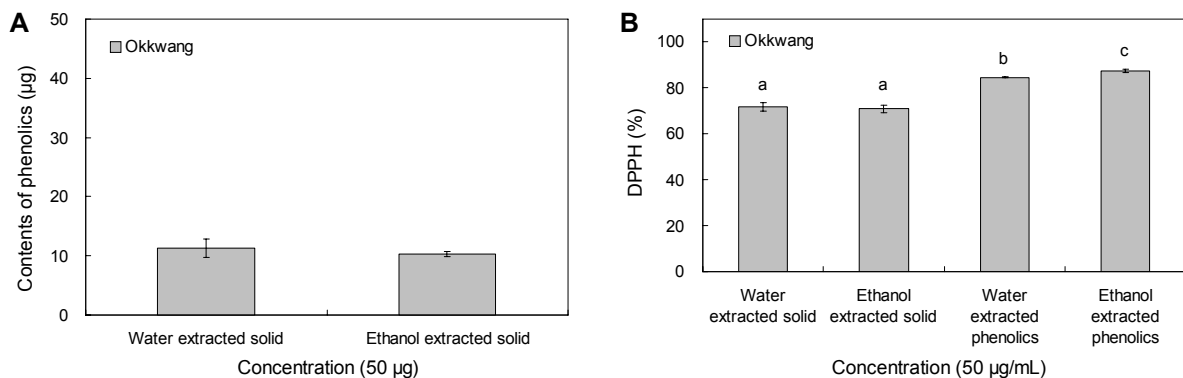


Fig. 1. The content of phenolic (A), DPPH activity (B) on solid and phenolic from Okkwang chestnut bur solid. Means with different letters above bars are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

OCS의 물, 에탄올 추출물 모두 높은 전자공여능을 확인할 수 있었다. 그 결과 OCP와 OCS 물, 에탄올 추출물에서는 생리활성물질인 phenolic 화합물의 함량의 차이에도 불구하고 유사한 생리활성 효과를 나타내는 것으로 보아 phenolic 화합물 외의 다른 유효성분이 함유된 것으로 예상하였으며, Kim(26)의 보고에 의하면 밤송이에 다양한 phenolic 화합물(ellagic acid, 1-*O*-galloyl- β -D-glucose, quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, (+)-catechin, quercetin)과 morin, naringenin 등의 화합물이 다량 함유되어 있다고 보고한 바 있다. 위의 결과에 따라 생리활성 효과에 대한 기능성을 탐색하고 OCS를 식품산업에 적용하기 위해 물과 40% 에탄올을 추출용매로 사용하여 추출한 고형분의 항산화 효과와 XOase, α -glucosidase, tyrosinase 저해 효과 등의 생리활성을 검증하였다.

옥광 추출물의 항산화 효과

체내에는 산화억제물질(anti-oxidant)과 산화촉진물질(pro-oxidant)이 항상성을 유지하며 균형을 이루고 있는데, 이 균형이 깨어져 산화촉진 쪽으로 기울게 되면 세포에 해로운 영향을 미치게 되고, 이런 유해한 작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 부른다. 산화적 스트레스는 활성산소에 의한 세포의 손상을 회복하는 데 실패하거나 체내 산소량의 증가, 항산화제 물질의 저하 등으로 인해 동맥경

화, 심장질환, 뇌졸중, 당뇨병, 암, 노화 등의 질병을 초래한다(27,28). 수용성 항산화제 중 대표적인 비타민 C는 세포질, 혈장, 세포외액과 같은 체내의 수용성 부분에서 활성산소와 반응하여 이를 불활성화시키며, 수용액상에서 +3가 철분(Fe^{3+})을 +2가 철분(Fe^{2+})으로 환원시켜 지방질을 과산화시키는 효소인 lipoxygenase의 활성을 저하시키는 항산화 작용을 한다(29). OCS의 항산화 효과를 평가하기 위해 해당소재인 OCS의 DPPH 전자공여능을 측정된 결과 Fig. 2A와 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 μ g/mL의 농도에서 85~88%의 전자공여능을 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 87~100%의 활성을 나타내어 전자공여능이 농도의존적으로 증가하였다. OCS를 이용하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과 Fig. 2B와 같이 OCS 물, 에탄올 추출물은 100 μ g/mL 이상의 농도에서 모두 100%의 매우 높은 활성을 나타내었다. Yu와 Oh(29)는 목이버섯 ethanol, acetone, ethyl acetate 추출물로 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과 DPPH에서는 각각 59, 47, 23%의 효과를 나타내었고, ABTS에서는 각각 32, 20, 10%의 효과를 나타내었다고 보고한 것과 비교했을 때 OCS의 수용성 항산화능이 비교적 높은 것으로 확인할 수 있었다. 지용성 항산화제로는 사람의 혈장 속에서 연쇄절단(chain-breaking) 항산화제로 존재하는 α -토코페롤과 β -카로틴이 잘 알려져 있으며, 카로티노이드인 β -카로틴은 그 종류가 약 600여 종으로

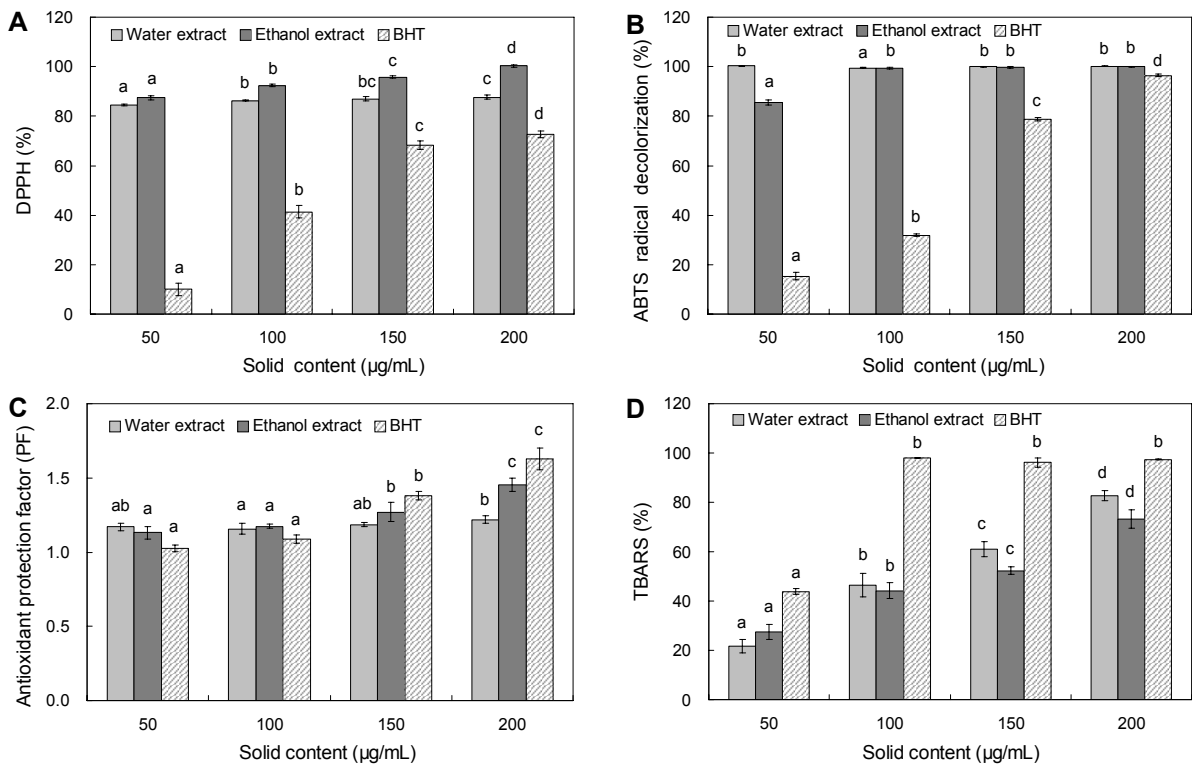


Fig. 2. Antioxidant activity of water and ethanol extracts from Okkwang chestnut bur solid. (A) DPPH, (B) ABTS, (C) PF, (D) TBARS. Means with different letters above bars of the same sample are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

분류되어 있다. β -카로틴은 11개의 이중 결합으로 구성되어 있어 높은 불포화 성질은 peroxy radical과 매우 쉽게 반응하는데 불포화된 탄소 중 하나에 선택적 연쇄 절단되어 항산화제로서 작용한다(25). OCS를 이용하여 PF를 측정된 결과 Fig. 2C와 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 1.17~1.22 PF를 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 1.13~1.45 PF를 나타내어 positive control로 사용한 BHT와 유사한 활성을 나타내었다. OCS를 이용하여 TBARS를 측정된 결과 Fig. 2D와 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 22~83%의 활성을 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 27~73%의 활성을 나타내었다. Lee 등(30)은 산딸나무 열매 추출물로 지용성 항산화능을 측정하는 PF와 TBARS를 측정된 결과 PF에서는 물, 에탄올 추출물에서 각각 1.93~2.21 PF, 1.82~2.18 PF의 항산화능을 나타내었고, TBARS에서는 에탄올 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 95%의 높은 효과를 나타내었다고 보고하여 OCS의 지용성 항산화능 또한 높은 효과를 나타내는 것으로 확인할 수 있었다. 따라서 OCS는 수용성, 지용성 항산화에 대한 높은 활성을 나타내어 합성항산화제를 대신할 수 있는 천연물 소재로 개발 가능성이 크다고 판단되었다.

옥광 추출물의 XOase 저해 효과

통풍은 여러 가지 원인에 의해 체내 요산 농도가 증가하고, 그로 인해서 과잉 축적된 요산이 결정화되면서 뾰족뾰족한 모양으로 형성되어 관절과 관절 주위 조직에 축적되면서 재발성 발작성 염증을 일으키는 질환이다. 요산과 직접적인 관련성이 잘 알려진 질환은 통풍이며(31), 통풍은 고요산혈증과 관련이 되어있으며, 혈중 요산염(urate)이 6.8 mg/dL (404 $\mu\text{mol/L}$) 이상일 때를 말한다. 요산은 체내의 퓨린(purine) 대사의 최종산물인데, 체내 대사과정 중 hypoxanthine과 xanthine이 XOase의 작용에 의해서 통풍을 유발시킬 수 있는 요산을 생성하게 되며, XOase는 통풍 발생에 결정적 역할을 수행하는 효소로 알려져 있다. 다른 포유류에서는 urate oxidase라는 효소가 존재하여 좀 더 수용성인 알란토인(allantoin)으로 변화되어 배설되지만, 사람에서는 요산으로 주로 간에서 형성되어 신장에서 걸러져 주로 소변으로 배설된다. 요산은 최근 연구에서 고혈압을 포함한 심혈관계 질환, 신질환, 복부비만, 당뇨병과 같은 대사 질환 등과의 관련성이 부각되고 있다(32). OCS를 이용하여 통풍 유발 물질인 요산을 생성하는 XOase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 3과 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 19~54%의 저해 효과를 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 20~43%의 저해 효과를 나타내었다. Yoon 등(33)은 성숙에 따른 딸보리수 열수 추출물로 XOase 저해 효과를 측정된 결과 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 미숙, 완숙, 과숙딸보리수에서 각각 30, 28,

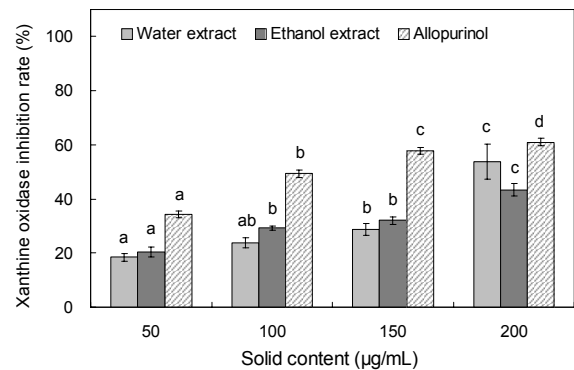


Fig. 3. Inhibitory activity of water and ethanol extracts from Okkwang chestnut bur solid on xanthine oxidase. Means with different letters above bars of the same sample are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

18%의 억제 효과를 나타내었다고 보고하여 OCS의 저해 효과가 비교적 우수한 것으로 확인되었다. Positive control로 사용한 allopurinol은 통풍의 예방 및 치료 방법인 요산을 낮춰 주는 치료제(urate-lowering therapy, ULT) 중 하나으로써 60년대 미국에서 허가받은 후 약 50년간 사용됐지만, 일부 환자들이 과민반응을 일으키며(34), 드물게 Stevens-Johnson syndrome(SJS), toxic epidermal necrolysis (TENS)와 같은 심각한 부작용이 나타나기도 한다고 알려져 있다. Allopurinol의 XOase 저해 효과를 측정된 결과 34~61%의 저해 효과를 나타내어 이와 비교하였을 때 OCS의 통풍 저해 효과 또한 확인할 수 있었다. 따라서 OCS의 통풍 예방 및 치료제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

옥광 추출물의 α -glucosidase 저해 효과

α -Glucosidase는 체내의 소장 내 말단에 존재하는 당분 해효소로서, 탄수화물로부터 α -glucose를 방출하는 α -glucosidic bond의 분해를 촉진하여 포도당을 흡수하는 데 관여하는 생체 내 필수 효소이다. 또한, 당단백질과 당지질이 합성하는 경우와 같은 다양한 대사 경로에도 관여하므로 이를 조절함으로써 대사 질환의 치료 가능성을 기대할 수 있다. α -Glucosidase inhibitor는 제2형 당뇨병의 치료에 이용되고 있지만, 장기간 복용할 경우 일부환자에게서 복부팽만감, 구토, 설사 등의 부작용이 나타날 수 있어서 사용이 제한될 수 있다(35). 체내의 당을 분해하여 당뇨에 영향을 줄 수 있는 효소인 α -glucosidase의 저해 효과를 평가하기 위해 OCS를 이용하여 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 4와 같이 OCS 물, 에탄올 추출물은 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 모두 95% 이상의 높은 저해 효과를 나타내었다. Han 등(36)은 로열젤리로 α -glucosidase 억제 효과를 측정된 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 로열젤리만 채취했을 경우에는 24%, 로열젤리와 봉독을 동시에 채취했을 경우에는 23%의 억제력을 나타내어 OCS의 α -glucosidase 저해 효과가 매우 높은 것으로 확인되었다. 위 결과와 같이 우수한 α -glu-

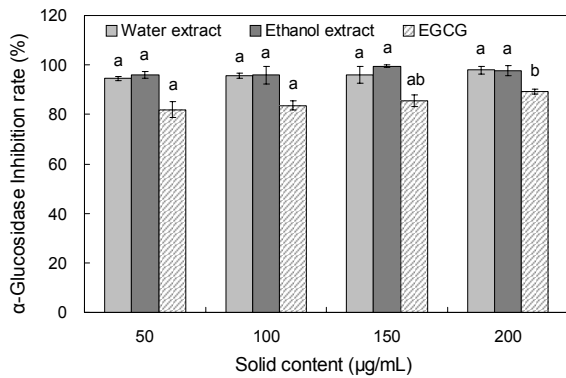


Fig. 4. Inhibitory activity of water and ethanol extracts from Okkwang chestnut bur solid on α -glucosidase. Means with different letters above bars of the same sample are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

cosidase 저해 효과를 나타낸 OCS를 이용하여 당단백질, 당지질이 합성하는 대사경로나 당뇨병 치료와 관련된 작용 기작에 적용시켰을 때 질병 치료에 대한 가능성이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

옥광 추출물의 tyrosinase 저해 효과

멜라닌은 단백질성 유기색소로 인간의 머리카락과 피부 색에 큰 관련이 있으며, 아미노산으로부터 합성되어 형성된다(37). 멜라닌은 노란색과 붉은색 계열의 pheomelanin과 갈색과 검은색 계열의 eumelanin으로 구분되며, 생물체에 널리 분포된 색소로 피부 속 기저층에 존재하는 melanocyte에서 생성되는 단백질 복합체이다. 멜라닌의 합성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1), tyrosinase related protein-2(TRP-2) 등에 의해 조절되고, tyrosinase는 멜라닌 생합성의 rate-limiting 효소로서 L-tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)으로, L-DOPA를 DOPA quinone으로 변환하여 멜라닌을 생합성한다(38). OCS를 이용하여 멜라닌 합성을 조절하는 효소인 tyrosinase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 5와 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 3~8%의 저해 효과를 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 3~27%의 저해 효과를 나타내었다. Mo와 Oh(39)가 측백나무 에탄올 추출물로 tyrosinase 억제 효과를 측정된 결과 5~400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 각각 9~45%의 억제 효과를 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때 OCS 추출물을 고농도로 처리하여 측정한다면 더 높은 tyrosinase 저해 효과를 나타낼 것으로 예상되었다.

옥광 추출물의 collagenase 및 elastase 효과

에스트로겐의 감소는 자연노화와 광노화의 주요한 원인 중 하나이며, 에스트로겐의 역할은 진피층의 섬유아세포를 자극하여 collagen 합성을 촉진시키며, collagen 대사에 관여해 collagen 분해효소인 collagenase의 발현을 억제하여

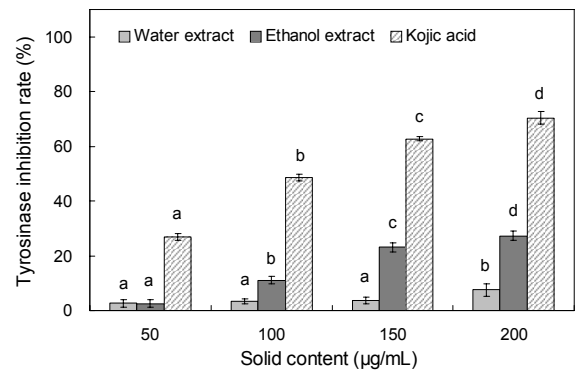


Fig. 5. Inhibitory activity of water and ethanol extracts from Okkwang chestnut bur solid on tyrosinase. Means with different letters above bars of the same sample are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

collagen 분해를 억제한다. 나이가 들어감에 따라 자연노화에 의해 에스트로겐의 생성이 증진되어 내분비성 노화가 촉진된다(40). 진피층은 피부의 물리 화학적인 성질을 결정하여 모세혈관과 표피에 영양을 공급해주는 중요한 역할을 하므로 피부의 노화와 밀접한 관련이 있다. Collagen은 진피층의 90% 이상으로 구성되어 있고 elastin은 진피층의 3~4% 정도를 차지하며 피부의 탄력에 영향을 준다. 세포 사이를 채우는 성분인 교원질과 탄력질의 합성이 자외선에 의해 감소하게 되면 다양한 기질 단백질 분해 효소가 발현이 증가하게 된다. 그러므로 피부 노화의 주원인인 collagen과 elastin 분해 효소인 collagenase와 elastase의 활성을 저해시켜서 주름과 같은 피부 노화를 억제할 수 있다(41). OCS를 이용하여 피부 세포의 뼈대 역할을 하는 collagen을 분해하는 효소인 collagenase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 6A와 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 47~93%의 저해 효과를 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 58~94%의 저해 효과를 나타내었다. OCS를 이용하여 피부 탄력을 유지하기 위해 세포 사이를 채우고 있는 elastin을 분해하여 주름을 발생시키는 효소인 elastase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 6B와 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 2~11%의 저해 효과를 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 7~56%의 저해 효과를 나타내어 피부 탄력에 영향을 주는 collagen과 elastin을 분해하는 collagenase, elastase에 대한 저해 효과를 확인하였다. Kim과 Na(42)는 유채박 추출물로 collagenase와 elastase 억제 효과를 측정된 결과 collagenase에서는 열수, 메탄올, 아세톤 추출물 0.5~1.0 mg/mL의 농도에서 21~41, 32~34, 67~68%의 억제력을 나타내었고, elastase에서는 메탄올, 아세톤 추출물 0.5~1.0 mg/mL의 농도에서 25~26, 47~48%로 억제력이 농도 의존적으로 증가한다고 보고하여 OCS의 collagenase, elastase 저해 효과가 비교적 우수한 것을 확인하였다.

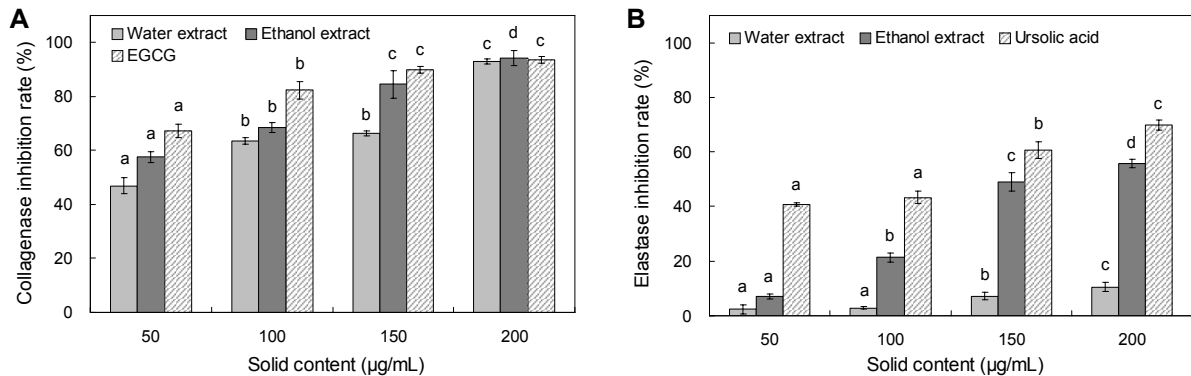


Fig. 6. Inhibitory activity of water and ethanol extracts from Okkwang chestnut bur solid on collagenase (A) and elastase (B). Means with different letters above bars of the same sample are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

옥광 추출물의 HAase 효과

고분자의 hyaluronic acid는 염증 형성의 주요 요인인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 반면, hyaluronic acid의 분해산물 혹은 저분자의 hyaluronic acid는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis, collagen deposition을 증가시킨다. 또한, HAase는 일반적으로 항상성 유지를 위해 불활성 형태로 리소좀 등에 존재하고 있지만, 신체적 상해나 류머티즘과 같은 염증성 질환이 발병하였을 때 활성화되어 혈관계 투과성 및 염증반응에 관여하므로 염증 유발 물질로 알려져 있으며, 알레르기 반응과 암세포 전이 등에도 관한다고 보고되었다(43). OCS를 이용하여 염증 유발과 관련이 있는 효소인 HAase 저해 효과를 측정된 결과 Fig. 7과 같이 OCS 물 추출물에서는 50~200 µg/mL의 농도에서 40~96%의 저해 효과를 나타내었고, OCS 에탄올 추출물에서는 50~200 µg/mL의 농도에서 0~52%의 저해 효과를 나타내어 통풍 예방 및 치료에 대한 억제제로서의 개발 가능성을 확인하였다. Kang 등(44)은 황기, 오미자, 황금 추출물로 항염증 효과를 측정된 결과 67, 51, 65%의 높은 HAase 억제 효과를 나타내었다고 보고하여 OCS 추출물의 우수한 항염증 효과를 확인하였다.

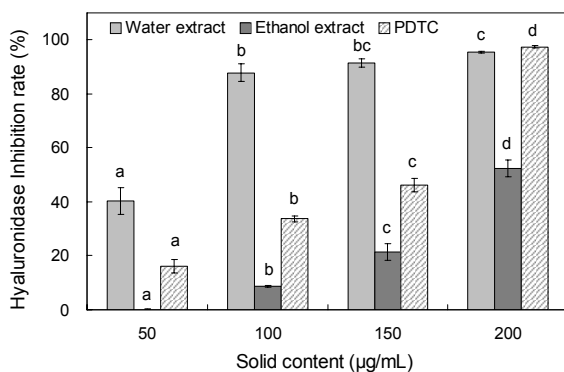


Fig. 7. Inhibitory activity of water and ethanol extracts from Okkwang chestnut bur solid on hyaluronidase. Means with different letters above bars of the same sample are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

요 약

옥광(Okkwang; *Castanea crenata*) 밤송이 고형분의 phenolic 화합물의 함량은 물, 40% 에탄올 추출물에서 각각 11.24, 10.28 µg/50 µg solid로 측정되었다. DPPH 라디칼 소거능은 물, 에탄올 추출물 50 µg/mL solid 농도에서 각각 85, 87%의 전자공여능을 나타내었고, ABTS 라디칼 소거능은 물, 에탄올 추출물에서 각각 100, 86%의 전자공여능을 나타내었다. PF에서는 물, 에탄올 추출물 200 µg/mL solid 농도에서 각각 1.22, 1.45 PF를 나타내었고, TBARS는 물 추출물에서 83%, 에탄올 추출물에서는 73%의 효능을 나타내었다. XOase 저해 효과는 물, 에탄올 추출물 200 µg/mL solid 농도에서 각각 54, 43%를 나타내었다. α-Glucosidase 저해 효과는 50 µg/mL solid 농도에서 물 추출물은 95%, 에탄올 추출물에서는 96%의 저해 효과를 나타내었다. 미백을 나타내는 tyrosinase 저해 효과는 200 µg/mL solid 농도에서 에탄올 추출물은 27%의 효능을 나타내었다. 주름개선을 보여주는 collagenase 저해 효과는 200 µg/mL solid 농도에서 물, 에탄올 추출물 각각 93, 94%의 우수한 주름개선 효과를 나타내었으며, elastase 저해 효과는 200 µg/mL solid 농도에서 에탄올 추출물은 56%의 효능을 나타내었다. 항염증 효과를 나타내는 HAase 저해 효과를 측정된 결과 200 µg/mL solid 농도에서 물, 에탄올 추출물에서 각각 96, 52%의 항염증 효과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 OCS 추출물은 항산화 활성, 통풍 억제, 항당뇨, 미백, 주름개선, 항염증 효과가 우수하므로 기능성 소재로서 사용이 가능할 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Yook CS. 1997. *Asia herbal book*. Kyungwon Publisher, Seoul, Korea. p 117.
2. Shin MK, Joung BB. 1990. *Illustration knowledge (herb medicine) unabridged dictionary*. Younglimsa Publisher, Seoul, Korea. p 806.
3. Jun DH. 2015. The study on verification of protection mech-

- anisms of skin aging caused by UVB and major compounds purification from fermentation by *Lactobacillus casei* in chestnut (*Castanea crenata*) bur. *PhD Dissertation*. Daegu Haany University, Daegu, Korea. p 1-9.
4. Yoon KY, Moon KD, Sohn TH. 1991. Polyphenol compounds and biochemical characteristics of polyphenol oxidase in Chinese chestnut. *Agric Res Bull Kyungpook Natl Univ* 9: 51-59.
 5. Jeong CH, Hur JY, Shim KH. 2002. Chemical components, antioxidative and antimicrobial activities of chestnut (*Castanea crenata*) leaves. *Korean J Food Preserv* 9: 234-239.
 6. Cho YJ, Chun SS, Choi C. 1993. Inhibitory effect of condensed tannins isolated from Korean green tea against xanthine oxidase. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 418-422.
 7. Kim JK, Kong YT, Jo JM. 1987. Studies on the utilization of chestnut bur (1). *Wood Sci & Tech* 15: 59-63.
 8. Cho SH, Sung NK, Ki WK, Hur JH, Shim KH, Chung DH. 1988. Effect of blanching on the prevention of discoloration in the thermal-treated chestnut powder. *J Korean Soc Food Nutr* 17: 211-214.
 9. Lee J, Lee SR. 1994. Analysis of phenolic substances contents in Korean foods. *Korean J Food Sci Technol* 26: 310-316.
 10. Shin SE, Cha WS, Seo JJ, Kim JS. 1999. A study on the adsorption of heavy metals by chestnut shell. *Korean J Biotechnol Bioeng* 14: 141-145.
 11. Yang MJ, Kim MG, Lim S, Ann HS, Ahn RM. 1999. Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji* 43: 494-501.
 12. Cha BC, Lee HW, Choi MY. 1998. Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor J Pharmacogn* 29: 28-34.
 13. Yook GJ, Lee HJ, Kim MK. 2002. Effect of chestnut and acone on lipid metabolism, antioxidative capacity and antithrombotic capacity in rats. *J Nutr* 35: 171-182.
 14. Folin O, Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239-243.
 15. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 16. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. 1999. 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 Enzymol* 299: 379-389.
 17. Andarwulan N, 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: 1776-1780.
 18. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302-310.
 19. Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
 20. Tibbot BK, Skadsen RW. 1996. Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative alpha-glucosidase gene from barley. *Plant Mol Biol* 30: 229-241.
 21. Hearing VJ Jr. 1987. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol* 142: 154-165.
 22. Wunsch E, Heidrich HG. 1963. Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 333: 149-151.
 23. Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G. 1996. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 35: 9090-9096.
 24. Dorfman A, OTT ML. 1948. A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem* 172: 367-375.
 25. Kwak IS. 2008. Comparison of different assays for evaluating antioxidant activity of polyphenols and tea extracts. *PhD Dissertation*. Chonbuk National University, Jeonju, Korea. p 15-17.
 26. Kim HJ. 2012. The study on verification of chestnut bur activation materials for cellular gene expression and cosmetic stability in lamellar liquid crystal emulsion. *MS Thesis*. Daegu Haany University, Daegu, Korea. p 5.
 27. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1985. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK. p 331-334.
 28. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 113: 189-207.
 29. Yu SC, Oh TJ. 2016. Antioxidant activities and antimicrobial effects of extracts from *Auricularia auricula-judae*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 327-332.
 30. Lee EH, Lee SH, Cho YJ. 2015. Biological activities of extracts from *Cornus kousa* fruit. *J Appl Biol Chem* 58: 317-323.
 31. Baker JF, Schumacher HR. 2010. Update on gout and hyperuricemia. *Int J Clin Pract* 64: 371-377.
 32. Yue TF, Gutman AB. 1964. Effect of allopurinol (4-hydroxypyrazolo-(3,4-D)pyrimidine) on serum and urinary uric acid in primary and secondary gout. *Am J Med* 37: 885-898.
 33. Yoon KY, Hong JY, Nam HS, Moon YS, Shin SR. 2007. Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of hot-water extracts from fruits of *Elaeagnus multiflora* Thunb. in maturity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 14-19.
 34. Tsai TF, Yeh TY. 2010. Allopurinol in dermatology. *Am J Clin Dermatol* 11: 225-232.
 35. Puls W, Keup U, Krause HP, Thomas G, Hoffmeister F. 1997. Glucosidase inhibition. A new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinaemia. *Naturwissenschaften* 64: 536-537.
 36. Han S, Baek H, Oh B, Lee K, Yeo J, Woo S, Kweon H, Nam S, Kim W, Jo Y, Kim G. 2009. Effect of venom collection using the method of electrical stimulation on antioxidant and antidiabetic activity of royal jelly. *Korean J Apiculture* 24: 121-126.
 37. Ye Y, Chu JH, Wang H, Xu H, Chou GX, Leung AK, Fong WF, Yu ZL. 2010. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *J Ethnopharmacol* 132: 533-535.
 38. Jeon YS, Jung YJ, Youm JK, Kim YK, Kim SN. 2013. Inhibitory effect of *Endarachne binghamiae* extract on melanin synthesis. *Korean J Plant Res* 26: 526-532.
 39. Mo JH, Oh SJ. 2015. Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of extracts of *Thuja orientalis*. *Kor J Aesthet Cosmetol* 13: 189-194.
 40. Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. 1999. Inhibitory effect of 150 plant extracts on elastase activity and their anti-inflammatory effects. *Int J Cosmet Sci* 21: 71-82.
 41. Chung JH. 2003. Photoaging in Asians. *Photodermatol Pho*

- toimmunol Photomed* 19: 109-121.
42. Kim SM, Na MS. 2013. A study on skin care effects of rape-seed meal extract. *KSBB J* 28: 177-184.
43. Jeong SJ, Ko YS, Ahn NH, Kim YC. 1998. Hyaluronidase inhibitor from *Uncariae Ramulus et Uncus*. *Kor J Pharmacogn* 29: 169-172.
44. Kang CH, Kwak DY, So JS. 2013. Inhibition of nitric oxide production and hyaluronidase activities from the combined extracts of *Platycodon grandiflorum*, *Astragalus membranaceus*, and *Schisandra chinensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 840-850.