

## 참죽의 추출방법에 따른 폴리페놀 분획의 생리기능성

오민희 · 윤경영\*  
영남대학교 식품영양학과

### Biological activity of crude polyphenol fractions of *Cedrela sinensis* isolated using different extraction methods

Min Hui Oh and Kyung Young Yoon\*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

**Abstract** The biological activity of crude polyphenol fractions (WphF, EphE, VphF, and SphF) extracted from *Cedrela sinensis* using hot water, ethanol, and enzymes such as Viscozyme and Shearzyme was examined in this study. The yield of VphF was the highest (43.44%) among all fractions. The total polyphenol and flavonoid content of the fractions were highest after ethanol extraction (447.98 and 337.49 mg/g, respectively). Fractions obtained after hot water and ethanol treatment showed high antioxidant activity. All fractions, except for WphF, showed a significantly higher  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity than the acarbose. EphF and WphF showed the high acetylcholinesterase inhibition activity. All fractions showed more than 50% tyrosinase inhibition activity at 2 mg/mL concentration. According to these results, the crude polyphenol fractions from *C. sinensis* showed high antioxidative,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, and tyrosinase inhibitory activities. This study suggests that crude polyphenol fractions from *C. sinensis*, especially the WphF and EphF fractions, are good sources of functional food.

**Keywords:** *Cedrela sinensis*, extraction method, antioxidant activity, polyphenol, biological activity

## 서 론

식물성 식품에 존재하는 파이토케미컬(phytochemical)은 식물의 뿌리나 잎에서 만들어지는 모든 화학물질을 의미하며 외부환경으로부터 자신을 방어하는 물질이다(1). 과일 및 채소는 항암효과, 심혈관 질병예방, 면역의 증진, 항미생물 및 노화 지연 효과가 있다고 보고됨에 따라 식물성 식품의 기능성에 관한 관심이 매우 높아졌다(2).

참죽(*Cedrela sinensis*)은 약으로 이용하는 식물 중 하나로써, 쥐손이풀목의 멸구슬나무과 낙엽교목으로 분류된다. 참죽은 참죽나무 잎의 새순으로 대나무처럼 먹는다고 하여 붙여진 이름이다(3). 참죽은 독특한 맛과 향을 가지고 있어 중국에서는 향춘, 저항이라고 불리며, 주로 장아찌, 김치, 부침으로 섭취된다. 참죽은 높은 폴리페놀(polyphenol) 및 플라보노이드(flavonoid) 함량으로 우수한 산화방지 활성을 보이며(4), 진통 작용에 효과가 있으며 살충, 소염, 장염, 이질 등의 치료에 이용되어 왔다(5).

식품 속에 함유된 생리활성 성분을 추출하기 위해 주로 용매추출법(4)과 열수추출법(6) 등이 이용되고 있다. 용매추출은 분배에 의한 것으로 얻고자 하는 성분과 용매와의 용해도, 극성 등과

안전성을 고려하여 선택하며, 추출대상 시료의 특성에 따라 용매의 선택은 달라진다. 물외의 헥세인(hexane), 에테르(ether), 에탄올(ethanol), 메탄올(methanol), 클로로폼(chloroform), 벤젠(benzene) 등의 유기용매가 주로 추출에 사용되고 있으나 이들은 독성이 있어 안전성의 문제가 되고 있다(7). 따라서 일반적으로 식물의 기능성 물질과 생리활성을 측정하기 위해 열수추출법이 많이 사용되고 있으나, 대부분 가용성 물질 추출로 인해 낮은 수율과 이로 인한 에너지 소비, 높은 열에 의한 유용성분의 파괴 등의 문제점이 있다(8). 이러한 단점을 보완하고 천연 추출물의 추출 효율을 높이기 위해 효소추출, 마이크로 추출 및 초음파 추출 등이 시도되고 있다(3). 효소추출은 추출과정에서 새로운 형태의 기능성 물질 생성과 비수용성 물질의 수용성 전환으로 기능성 및 추출 효율을 높이며, 용매추출에 비해 안전성이 높다는 장점을 가진다(9).

따라서 본 연구에서는 열수, 에탄올 및 효소(Viscozyme, Shearzyme)를 이용하여 참죽으로부터 폴리페놀을 추출하고 이들 추출물의 산화방지 활성을 비롯한 acetylcholinesterase (AChE),  $\alpha$ -glucosidase 및 tyrosinase 저해활성을 측정하여 기능성 식품소재로의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 참죽(*Cedrela sinensis*)은 경상북도 상주시에 서 재배된 것으로 15-22 cm 길이의 참죽을 상주 외서농협을 통해 구입하였다. 참죽은 이물질을 제거하고 냉동동결건조 후 Food Mixer (FM-681C, Hanil, Incheon, Korea)를 이용하여 마쇄한 후 45 mesh (Chung Gye Indus. MFG Co., Seoul, Korea)로 체질하

\*Corresponding author: Kyungyoung Yoon, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38541, Korea  
Tel: +82-53-810-2878  
Fax: +82-53-810-4768  
E-mail: yoonky2441@ynu.ac.kr  
Received March 14, 2017; revised May 8, 2017;  
accepted May 9, 2017

었다. 그 후 추출과정을 거쳐 -40°C deep freezer (MDF, Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

효소 추출을 위해 사용된 효소는 자일로스 가수분해효소(xylanase) 활성을 가지는 Shearzyme plus (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)와 아라반 가수분해효소(arabanase), 베타글루칸 가수분해효소( $\beta$ -glucanase), 헤미셀룰로스 가수분해효소(hemicellulase), 자일로스 가수분해효소 활성을 나타내는 Viscozyme L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)을 사용하였다.

### 폴리페놀 추출

참죽으로부터 폴리페놀을 추출하기 위하여 열수추출, 에탄올추출, 효소추출(Viscozyme, Shearzyme)을 하였다. 열수추출과 에탄올추출은 참죽 동결건조 시료 25 g 당 20배에 해당하는 용매(distilled water, 80% 에탄올) 500 mL를 넣어 잘 섞은 다음, 열수 및 에탄올 추출은 각각 90°C와 60°C의 온도 하에서 100 rpm, shaking water bath (BS-11, JeioTech, Seoul, Korea)에서 3시간 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 추출액은 4°C, 7,000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 거름종이(filter paper, Whatman No. 1, Maidstone, England)로 여과하여 추출액을 얻었다. Viscozyme 및 Shearzyme을 이용한 효소추출은 효소의 최적 pH와 온도를 참조하여 Oh 등(10)의 방법에 따라 추출하였다. 즉, 참죽 동결건조 시료 25 g에 기질의 1%(v/w)에 해당하는 효소(Viscozyme, Shearzyme)와 0.1 N acetate buffer (pH 4.5) 500 mL를 넣어 50°C, 100 rpm, shaking water bath (BS-11, JeioTech, Seoul, Korea)에서 48시간 동안 교반하였다. 그 후 100°C에서 5분 동안 효소를 불활성화 시킨 뒤 4°C, 7,000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음 거름종이(Whatman No. 1, Maidstone, England)로 여과하였다. 이때 얻어진 여과액은 1 M NaOH를 사용하여 pH를 7로 조정하여 추출액으로 사용하였다. 추출액에 함유된 다당류 등을 제거하기 위하여 각 추출방법에 따라 얻은 추출액 2배의 99% 에탄올을 가하여 상온에서 1시간 동안 침지시켰다. 그 후 4°C, 7000 rpm에서 20분간 원심분리 하였으며, 얻어진 상층액을 동결건조 하여 폴리페놀 분획(crude polyphenol fraction)으로 사용하였다. 이 때 에탄올추출은 침지하기 전 여과하여 얻은 추출액을 폴리페놀 분획으로 칭하였다. 열수추출, 에탄올추출, Viscozyme 추출 및 Shearzyme 추출을 각각 WphF, EphF, VphF 및 SphF로 나타내었으며, 각 추출물의 수율은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{수율(\%)} = \frac{\text{추출 후 분획물의 건조 중량(g)}}{\text{추출에 사용된 참죽의 건조 중량(g)}} \times 100$$

### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(11)에 의해 측정하였다. 즉, 동결건조 후 일정한 농도로 제조된 각 추출물 0.2 mL와 폴린-시오칼토페놀시약(Folin-ciocalteu's phenol reagent) 0.2 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분 동안 방치하였다. 그 후 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4 mL를 가한 후 증류수 4 mL를 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총 폴리페놀 함량은 갈산(gallic acid, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용한 표준곡선으로부터 얻었다.

총 플라보노이드 함량은 Im 등(4)의 방법으로 측정하였다. 각 추출물 0.5 mL씩 시험관에 취한 후 10% 질산알루미늄(aluminum nitrate)과 1 M 아세트산칼륨(potassium acetate)을 각각 0.1 mL를 넣은 후 80% 에탄올 4.3 mL를 취하여 잘 혼합하여 준다. 그 후 실온에서 40분 동안 반응 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이 때 퀘세틴(querctetin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 얻은 표준곡선을 통해 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

### 산화방지 활성 측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거능은 Im 등(4)의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 추출물을 각 시험관에 0.5 mL씩 취한 후 0.2 mM DPPH 용액 1 mL와 10초간 vortex mixing하였다. 이를 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후 분광광도계(Spectrophotometer, U-2900, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 라디칼 소거활성은 Kim 등(5)의 방법을 일부 수정하여 실험하였다. ABTS 7 mM과 과황산칼륨(potassium persulfate) 2.45 mM을 증류수에 용해하여 12-16시간 동안 암실에 방치하여 ABTS caution radical ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ )을 형성한 후 이 용액을 80% 에탄올을 이용하여 734 nm에서 0.700±0.002의 흡광도를 되도록 희석하였다. 각 추출물 50  $\mu\text{L}$ 와 희석된 ABTS 용액 1 mL 잘 혼합하여 실온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$\text{Fe}^{2+}$  킬레이팅 활성은 Dinis 등(12)의 방법을 응용하여 측정하였다. 각 추출물을 시험관에 1 mL씩 가하여 2 mM  $\text{FeCl}_2$ 와 5 mM Ferrozine [3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid] 각각 25  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 혼합하였다. 이를 실온에서 10분 동안 방치한 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원력은 Mau 등(13)의 방법으로 측정하였다. 각 추출물을 농도별로 증류수에 녹인 후 e-tube에 250  $\mu\text{L}$ 씩 취하였다. 그 후 0.2 M 인산나트륨완충용액(sodium phosphate buffer, pH 6.6)와 1% 페리사이안화칼륨(potassium ferricyanide,  $\text{KFe}(\text{CN})_6$ )을 각각 250  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 잘 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 후 10% 트라이클로로아세트산(trichloroacetic acid,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) 250  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 위 반응액을 25°C, 1000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 500  $\mu\text{L}$ 와 0.1% ferric chloride ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하였다. 그 후 700 nm에서 microplate reader (EPOCH, BioTek Instrument Inc, Winooski, VT, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### Acetylcholinesterase (AChE) 저해활성 측정

Acetylcholinesterase (AChE) 저해활성은 Atta-ur-Rahman(14)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 200 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 시료 200  $\mu\text{L}$ , DTNB 80  $\mu\text{L}$ , 0.2 U/mL acetylcholinesterase 10  $\mu\text{L}$ 를 micro-well plate에 넣고 혼합한 뒤, 25°C에서 5분 동안 배양한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구는 시료 대신 phosphate buffer를 사용하였다.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

$\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 Im과 Yoon(15)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 각 농도별 시료 50  $\mu\text{L}$ 와  $\alpha$ -glucosidase 0.2 U/mL 50  $\mu\text{L}$ , 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 50  $\mu\text{L}$ 와 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 다음 3 mM pNPG ( $p$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, Sigma, St. Louis, MO, USA) 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이 반응액에 0.1 M NaOH 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 기질 무첨가구는 blank로 사용하였으며, 시료 무첨가구는 음대조구(negative control)로 사용하였고, acarbose (Sigma)를 양대조구(positive control)로 사용하였다.

### Tyrosinase 저해활성

Tyrosinase 저해활성은 L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine) 를 기질로 사용하여 dopachrome의 형성을 확인하여 결과를 나타내었다(16). 50 mM 인산소듐원충용액(pH 6.8) 25  $\mu$ L에 1.5 mM L-DOPA 25  $\mu$ L, 분획물 20  $\mu$ L, tyrosinase (500 unit/mL) 30  $\mu$ L와 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 반응액 중 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며, tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 차이로 구하였다.

### 통계처리

본 실험의 결과는 3회 반복으로 수행된 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과에 대한 통계분석은 SPSS (Ver. 21, Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 일원배치 분산분석법으로 실시하였으며, 실험의 평균치간의 유의적 차이는 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)으로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 수율, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 수율, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다. 4가지 추출군에서 VphF가 43.44%로 유의적으로 가장 높은 수율을 보였다. Kim 등(17)의 연구에서 보리 효소추출물의 폴리페놀 수율을 측정된 결과, 효소처리한 보리의 폴리페놀 수율이 효소처리 하지 않은 보리에 비해 높은 것으로 보고되어 본 연구의 결과와 유사하였다. 이는 효소처리를 통해 불용성의 고분자 물질을 수용성의 저분자 화합물로 분해시켜 수율이 높아진 것으로 판단된다. SphF는 37.01%로 WphF (36.67%)보다 높은 수율을 보였으나 두 추출물 간의 유의적인 차이는 없었다. EphF의 수율은 26.96%로 4가지 추출군 중 가장 낮은 수율을 나타내었다.

각 추출법에 따른 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획물의 총 폴리페놀 함량은 EphF이 447.98 mg GAE/g으로 가장 높은 함량을 보였으며, 다음으로 WphF 333.21 mg GAE/g, VphF 296.52 mg GAE/g, SphF 230.56 mg GAE/g의 총 폴리페놀 함량을 보였다. 차가버섯의 페놀성 화합물은 에탄올추출이 열수추출보다 2.8 배 이상 유의적으로 높은 함량을 보였으며(18), 오미자 에탄올추출은 열수추출보다 유의적으로 높은 폴리페놀 함량을 나타내어(19), 본 연구와 비슷한 경향을 보였다. VphF는 SphF보다 유의적으로 높은 폴리페놀 함량을 보였는데, 이는 Viscozyme이 Shearzyme보다 세포벽 분해를 용이하게 하여 페놀성 화합물 및 생리활성 물질의 용출을 증가시킨 것으로 판단된다. 국내산 산채류를 열수

또는 메탄올을 이용하여 폴리페놀을 추출한 후 각 추출물의 폴리페놀 함량을 측정된 결과(20), 쑥 37.6 mg/g, 두릅나무 36.0 mg/g, 송이풀 128.2 mg/g의 함량을 보인다고 보고되어 이들 산채류에 비해 참죽의 폴리페놀 함량이 매우 높음을 알 수 있었다. 이는 각 추출방법에 따라 추출 후 에탄올을 이용하여 다당류 등을 비롯한 분자량이 큰 가용성 성분을 제거함으로써 분획에 함유된 폴리페놀 화합물이 상대적으로 높아진 것으로 판단된다.

플라보노이드는 페닐기 2개가 C3 사슬을 매개하여 결합한 형태로 C6-C3-C6의 탄소 골격구조로 되어 있다. 담황색 또는 노란색을 띠는 폴리페놀 화합물로서 야채, 과일, 종실류 등 식물계에 널리 분포되어 있다. 천연 산화방지제인 플라보노이드는 플라보놀(flavanol), 플라바논(flavanone), 아이소플라본(isoflavone), 안토시아니딘(anthocyanidin)이 속해 있고 폴리페놀류에 포함된다(21). 식물성 폴리페놀류의 플라보노이드는 항암, 산화방지, 고혈압 억제 등 다양한 생리활성을 나타낸다(22). 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량과 유사한 경향으로 EphF (337.49 mg QE/g), WphF (261.41 mg QE/g), VphF (198.50 mg QE/g), SphF (175.76 mg QE/g) 순을 보였으며, EphF가 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다. 따라서 참죽 폴리페놀 분획, 특히 EphF에는 플라보노이드 함량이 높아 다양한 생리기능성을 가질 것으로 판단된다.

### 산화방지 활성

산화방지 물질은 생체막의 활성산소 및 지질과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 라디칼에 전자를 제공함에 따라 연쇄반응을 정지시킨다. 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 산화방지 활성을 측정하기 위해 전자공여능, ABTS 라디칼 소거능, 환원력 및  $Fe^{2+}$  킬레이트링 효과를 측정하고, 이들의  $IC_{50}$ 을 구하여 Table 2에 나타내었다.

참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, EphF의  $IC_{50}$ 이 20.76  $\mu$ g/mL로 가장 낮은 값을 보였으며, WphF (26.00  $\mu$ g/mL), SphF (37.23  $\mu$ g/mL), VphF (43.60  $\mu$ g/mL) 순으로 낮은  $IC_{50}$ 을 나타내었다. SphF는 VphF에 비해 높은 라디칼 소거능을 보였는데, 이는 SphF가 VphF보다 효소 분해에 의해 특정 라디칼을 소거할 수 있는 화합물의 용출이 보다 용이해져 유의적으로 높은 소거능을 보이는 것으로 판단된다(23). 산채류 추출물 연구에서는 폴리페놀과 DPPH 라디칼 소거능과 양의 상관관계를 보인다고 보고하였으며(24), 본 연구의 EphF와 WphF 또한 라디칼 소거능과 폴리페놀 함량과의 양의 상관관계를 보여 유사한 경향을 보였다. 그러나 SphF의 소거능은 폴리페놀 함량이 높은 VphF보다 높은 활성을 보여 상이한 결과를 보였다. 이와 같이 폴리페놀 화합물의 함량이 낮은 추출물에서도

**Table 1. Total yields, total polyphenol and flavonoid contents of crude polyphenol fractions isolated from *C. sinensis* using different extraction methods**

Sample	Total yield (%)	Total polyphenol content (mg GAE/g extract powder)	Total flavonoid content (mg QE/g extract powder)
VphF	43.44 $\pm$ 3.29 <sup>a</sup>	296.52 $\pm$ 4.16 <sup>c</sup>	198.50 $\pm$ 1.36 <sup>c</sup>
SphF	37.01 $\pm$ 2.06 <sup>b</sup>	230.56 $\pm$ 5.48 <sup>d</sup>	175.76 $\pm$ 5.12 <sup>d</sup>
WphF	36.67 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	333.21 $\pm$ 10.53 <sup>b</sup>	261.41 $\pm$ 8.09 <sup>b</sup>
EphF	26.96 $\pm$ 3.04 <sup>c</sup>	447.98 $\pm$ 21.13 <sup>a</sup>	337.49 $\pm$ 4.13 <sup>a</sup>

Results represent mean and standard deviation ( $n=3$ )

VphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; SphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using hot water; EphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using ethanol.

Values with different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ )

**Table 2. Antioxidant activity of crude polyphenol fractions isolated from *C. sinensis* using different extraction methods**

Sample	IC <sub>50</sub> value			
	DPPH radical scavenging ability (µg/mL)	ABTS radical scavenging ability (mg/mL)	Fe <sup>2+</sup> chelating ability (mg/mL)	Reducing power (mg/mL)
VphF	43.60±11.22 <sup>d</sup>	1.43±0.01 <sup>c</sup>	22.08±2.35 <sup>d</sup>	2.30±0.21 <sup>d</sup>
SphF	37.23±3.70 <sup>c</sup>	1.05±0.03 <sup>b</sup>	17.62±0.98 <sup>c</sup>	1.54±0.09 <sup>b</sup>
WphF	26.00±2.67 <sup>b</sup>	0.92±0.04 <sup>a</sup>	7.23±0.29 <sup>b</sup>	2.22±0.27 <sup>c</sup>
EphF	20.76±0.60 <sup>a</sup>	0.85±0.02 <sup>a</sup>	3.85±0.15 <sup>a</sup>	0.93±0.26 <sup>a</sup>

Results represent mean and standard deviation (n=3).

VphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; SphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using hot water; EphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using ethanol.

Values with different letters in the same column are significantly different (p<0.05).

DPPH 라디칼 소거능이 높은 것은 페놀화합물이 라디칼을 효과적으로 제거하나 페놀성 물질이 라디칼 종류에 따라 선택적으로 작용하여 상이한 결과를 보인 것으로 판단된다(25).

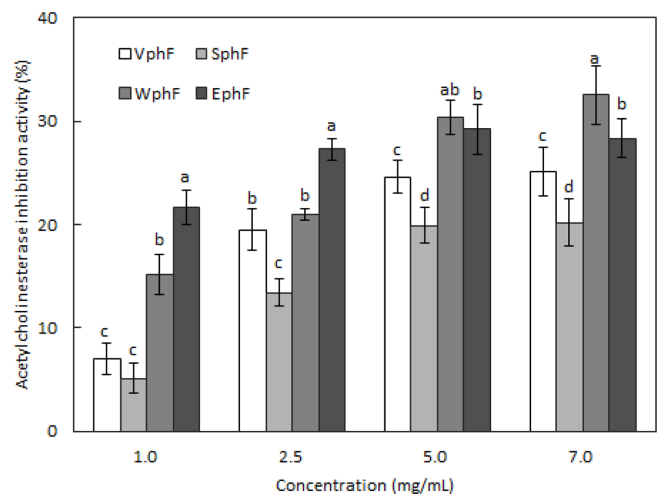
참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획물의 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과는 DPPH 라디칼 소거능과 유사한 경향을 나타내었다 즉, EphF의 IC<sub>50</sub>이 0.85 mg/mL로 가장 낮은 값을 보였으며, WphF, SphF, VphF가 각각 0.92, 1.05, 1.43 mg/mL 순으로 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 또한 모든 추출로부터 얻은 폴리페놀 분획의 ABTS 라디칼 소거능이 DPPH 라디칼 소거능에 비해 다소 낮은 결과를 보였다. 이는 32 종의 허브류 효소추출물의 라디칼 소거능을 측정된 결과 DPPH 라디칼 소거능이 ABTS 라디칼 소거능보다 높은 소거능을 보인 연구(26)와 비슷한 경향을 보였다.

참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 효과를 측정된 결과, 라디칼 소거능과 유사한 경향을 보였다. 각 추출물 간 IC<sub>50</sub>은 유의적이 차이가 있었으며, EphF의 IC<sub>50</sub>이 가장 낮은 값(3.85 mg/mL)을 보였으며, VphF가 가장 높은 값(22.08 mg/mL)을 나타내었다. 라디칼 소거능에 비해 참죽 폴리페놀 추출물은 낮은 Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 효과를 보였는데, 이는 라디칼 소거능과 금속이온 제거능은 다른 메커니즘으로 이루어지므로 Fe<sup>2+</sup> 킬레이팅 효과가 상대적으로 낮은 활성을 보인 것으로 판단된다(27). 산화환원에 관여하는 금속이온의 금속염은 지질산화 과정의 촉매제 역할을 하여 식품 속의 Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>와 같은 금속은 라디칼의 생성을 촉진시킨다. 금속이온을 킬레이팅 함으로써 지질산화 과정의 촉매작용을 감소시켜 자유라디칼의 생성 또한 억제시킨다(28).

참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획물의 환원력을 측정된 결과, EphF, SphF, WphF 및 VphF의 환원력 IC<sub>50</sub>은 0.93, 1.54, 2.22 및 2.30 mg/mL로 EphF의 환원력이 유의적으로 가장 높게 나타났다. 이는 1 mg/mL 농도의 미나리(27) 및 천년초(29) 에탄올추출물의 환원력 0.45과 0.157에 비해 높은 값으로 에탄올에 의해 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획물이 높은 환원력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 레덕톤(reductone), 비타민 C와 같이 인도페놀 화합물을 환원시킬 수 있는 물질과 thioenol, ene-amino, ene-diamine 등과 같은 활성기를 가지고 있는 화합물은 유리 라디칼과 반응하여 산화반응을 종결시킬 수 있으며(30), 본 연구의 EphF도 이와 같은 물질들의 영향으로 높은 환원력을 보인 것으로 판단된다.

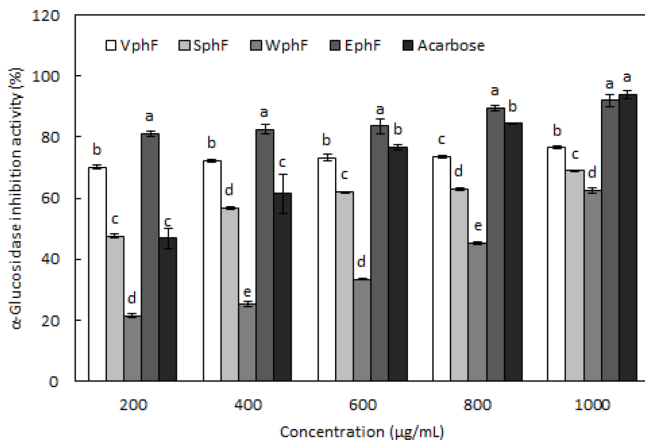
**Acetylcholinesterase (AChE) 저해활성**

참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획물의 acetylcholinesterase (AChE) 저해활성은 Fig. 1에 나타내었다. 추출물의 2.5 mg/mL 농도에서 EphF, WphF, VphF, SphF는 27.29%, 20.96%, 19.48%,



**Fig. 1. Acetylcholinesterase inhibition activity of crude polyphenol fractions isolated from *C. sinensis* using different extraction methods.** Results represent mean and standard deviation (n=3). VphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; SphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using hot water; EphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using ethanol. Values with different letters are significantly different (p<0.05).

13.44% 순으로 저해활성을 보였다. 그러나 5 mg/mL 농도에서는 WphF 30.37%, EphF 29.21%를 나타내었으며, 7 mg/mL에서는 WphF와 EphF가 각각 32.54% 및 28.34%의 저해활성을 보여 WphF가 유의적으로 높은 AChE 저해활성을 보였다. 신경조직에 존재하는 acetylcholine (ACh)은 신경자극을 전달하는 화학물질로 시냅스에서 신경말단으로 분비되어, 체내 전반적인 신경전달에 중요한 역할을 한다(31). 치매 환자의 경우 뇌의 신경세포가 감소함에 따라 신경자극을 전달하는 ACh의 함량이 낮으며 정상인에 비해 50%가량 감소된 함량으로 인지기능이 저하된다고 알려져 있다(22). 따라서 ACh를 분해하는 AChE의 활성을 저해하고 ACh를 증가시키는 물질을 치매 치료에 사용하고 있다. 따라서 WphF와 EphF가 다른 추출물에 비해 다소 높은 AChE 저해활성을 나타내어 인지기능 저하 예방에 효과가 있을 것으로 판단된다. 일반적으로 AChE는 플라보노이드, 알칼로이드, 탄닌과 같은 물질에 의해 활성을 저해한다고 보고하고 있으나(32) 본 연구에서는 EphF의 플라보노이드 함량이 WphF보다 높은 함량을 보여 상이한 결과를 보였다.



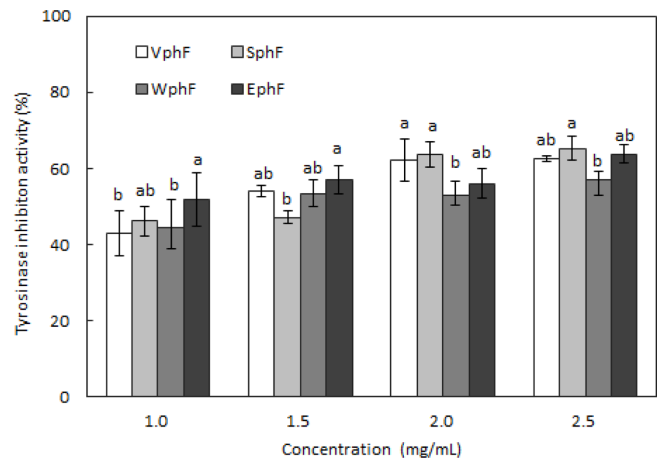
**Fig. 2.**  $\alpha$ -Glucosidase inhibition activity of crude polyphenol fractions isolated from *C. sinensis* using different extraction methods. Results represent mean and standard deviation ( $n=3$ ). VphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; SphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using hot water; EphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using ethanol. Values with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

#### $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획물의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 본 연구의 모든 추출군에서 농도가 증가함에 따라  $\alpha$ -glucosidase 저해효과가 증가하는 경향을 보였다. 현재 시판되고 있는 당뇨 치료제인 아카보스를 대조군으로 하여 저해효과를 측정된 결과, 200  $\mu$ g/mL 농도에서 아카보스는 46.80%의 저해활성을 보였으며, EphF, VphF, SphF, WphF 순으로 각각 81.14, 70.14, 47.57, 21.48%의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 보였다. 특히, EphF, SphF, VphF는 대조군인 아카보스보다 유의적으로 높은 활성을 보였다. 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 모든 추출군이 60% 이상의 저해율을 보였으며 EphF와 대조군인 아카보스는 90% 이상의 저해율을 나타내었다. 당뇨병은 인슐린이 생성되지 않아 혈액 내에 쌓여 고혈당 상태가 유지되어 합병하며 망막증, 고혈압 등의 다양한 합병증을 초래한다.  $\alpha$ -Glucosidase는 탄수화물을 단당류로 분해하는 효소로서 탄수화물 소화에 중요한 역할을 한다(33). 인슐린이 부족하여 당 대사가 원활이 이루어지지 않는 당뇨병자들에게는  $\alpha$ -glucosidase 활성이 저해되어야 한다. 본 연구결과 에탄올 추출군은 당뇨병 치료제인 아카보스의 역할을 대신할 수 있을 만큼의  $\alpha$ -glucosidase 저해효과를 보여 혈당을 낮추는데 효과적일 것으로 판단된다.

#### Tyrosinase 저해활성

참죽으로부터 추출된 각 폴리페놀 분획의 tyrosinase 저해활성은 Fig. 3에 나타내었다. 1.0 mg/mL 농도에서는 EphF가 51%로 다른 추출군에 비해 유의적으로 높은 저해활성을 보였으며 그 다음 SphF가 46.11%로 높았다. WphF, VphF는 각각 44.56, 42.86%의 tyrosinase 저해활성을 보였으며, 두 추출군간 유의적인 차이는 없었다. 2.0 mg/mL 농도에서는 모든 추출군에 50% 이상의 저해활성을 보였다. 2.5 mg/mL 농도에서는 SphF 65.28%, EphF 63.73%, VphF 62.86%, WphF 56.99% 순으로 저해활성을 보였다. 가죽나무 잎 열수추출물은 2 mg/mL 농도에서 16.33% 저해활성을 보였으며(34), 청미레당굴 잎의 화합물 중 플라보노이드 계열



**Fig. 3.** Tyrosinase inhibition activity of crude polyphenol fractions isolated from *C. sinensis* using different extraction methods. Results represent mean and standard deviation ( $n=3$ ). VphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Viscozyme; SphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using Shearzyme; WphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using hot water; EphF, crude polyphenol fraction extracted from *C. sinensis* using ethanol. Values with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

의 화합물중 캄페롤(kaempferol)이 뛰어난 tyrosinase 저해활성을 보인다고 보고되었다(19). 또한 캄페롤 외에도 tyrosinase 저해활성에 보고되는 화합물은 페놀화합물의 phenyl chromone, flavan 3-ol류와 스틸벤(stilbene)계 화합물, isoflavonoid류 등이 있다(35). 따라서 본 연구의 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획에도 캄페롤과 같은 화합물이 많을 것으로 추측되며, 따라서 향후 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 플라보노이드 화합물의 규명 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 요 약

다양한 영양성분을 함유할 뿐만 아니라 생리활성이 우수한 참죽의 기능성 식품소재로의 이용가능성을 확인하고자 참죽으로부터 폴리페놀을 추출하고 이들의 생리기능성을 측정하였다. 이를 위해 동결건조된 참죽분말을 열수, 에탄올 및 효소(Viscozyme, Shearzyme)를 이용하여 폴리페놀을 추출하고 추출방법에 따른 폴리페놀 분획의 기능적 특성을 비교하였다. 참죽으로부터 추출된 폴리페놀 분획의 수율은 VphF가 43.44%로 가장 높았으며, 그 다음 SphF, WphF, EphF 순으로 나타났다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 EphF가 각각 447.98 mg GAE/g 및 337.49 mg QE/g으로 가장 높은 함량을 보였다. 산화방지 활성을 측정된 결과, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능,  $Fe^{2+}$  킬레이팅 효과 및 환원력 모두 EphF가 유의적으로 가장 높았다. Acetylcholinesterase 저해활성을 측정된 결과, 저농도에서는 EphF가, 고농도에서는 WphF가 가장 높은 활성을 보였다.  $\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 EphF, VphF, SphF, WphF 순으로 높은 활성을 보였으며, 특히 EphF, SphF, VphF는 대조군인 아카보스보다 유의적으로 높은 활성을 보였다. Tyrosinase 저해활성 측정 결과, 2 mg/mL 농도에서 모든 추출군은 50% 이상의 저해활성을 보였다. 이상의 연구 결과, 참죽의 폴리페놀 분획은 우수한 산화방지 활성 뿐만 아니라  $\alpha$ -glucosidase, acetylcholinesterase, tyrosinase 효소에 대한 높은 저해활성을 보였으며, 특히 에탄올추출 및 열수추출에

의해 얻어진 폴리페놀 분획은 뛰어난 산화방지 활성을 보였다. 이를 통해 참죽은 기능성 식품 소재로 활용가능성이 매우 높을 것으로 판단된다.

## References

1. Na HS, Kim JY, Yun SH, Park HJ, Choi GC, Yang SI, Lee JH, Cho JY. Phytochemical contents of agricultural products cultivated by region. *Korean J. Food Preserv.* 20: 451-458 (2013)
2. Li HB, Wong CC, Chen KW, Chen F. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 385-390 (2008)
3. Oh MH, Hwang YJ, Yoon KY. Biological activity of water-soluble polysaccharides from *Cedrela sinensis* according to extraction methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 215-221 (2017)
4. Im HJ, Jang HR, Jeong YJ, Yoon KY. Chemical properties and antioxidant activities of the sprouts of *Kalopanax pictus*, *Cedrela sinensis*, *Acanthopanax cortex* at different plucking times. *Korean J. Food Preserv.* 20: 356-364 (2013)
5. Kim MH, Jang HL, Lim YJ, Yoon KY. Antioxidant activities of *Cedrela sinensis* hydrolysates prepared using various enzymes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 413-418 (2015)
6. Shin, HJ, Jeon YJ, Shin HJ. Physiological activities of extracts of *Cedrela sinensis* leaves. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.* 23: 164-168 (2008)
7. Ko SC, Kang SM, Ahn G, Yang HP, Kim KN, Jeon YJ. Antioxidant activity of enzymatic extracts from *Sargassum coreanum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 494-499 (2010)
8. Shin SL, Lee CH. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J. Life Sci.* 21: 56-61 (2011)
9. Kim YC, Cho CW, Rhee YK, Yoo KM, Rho JH. Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1482-1485 (2007)
10. Oh MH, Jang HL, Lim YJ, Yoon KY. Antioxidant activities of *Cedrela sinensis* hydrolysates prepared using various enzymes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 413-418 (2015)
11. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-243 (1912)
12. Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169 (1994)
13. Mau JL, Lin HC, Song SF. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res. Int.* 35: 519-526 (2002)
14. Atta-ur-Rahman, Choudhary MI, Thomsen WJ. *Bioassay techniques for drug development.* Harwood academic publishers, Amsterdam, Netherlands. pp. 142-143 (2001)
15. Im HJ, Yoon KY. Production and characterisation of alcohol-insoluble dietary fibre as a potential source for functional carbohydrates produced by enzymatic depolymerisation of buckwheat hulls. *Czech J. Food Sci.* 33: 449-457 (2015)
16. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DH. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 891-896 (1995)
17. Kim WJ, Ko HK, Yoon SK. Effects of enzyme treatments on quality and yields of barley tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 583-589 (1989)
18. Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 684-690 (2008)
19. Kim SH, Ahn JH, Jeong JY, Kim SB, Jo YH, Hwang BY, Lee MK. Tyrosinase inhibitory phenolic constituents of *Smilax china* leaves. *Korean J. Pharmacogn.* 44: 220-223 (2013)
20. Lee YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. Antioxidant activity in water and methanol extracts from Korean edible wild plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40: 29-36 (2011)
21. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. Vol 24. pp. 117-191. In: *World Review of Nutrition and Dietetics.* Bourne GH (ed). S. Karger, Switzerland. (1976)
22. Yoshizawa S, Horiuchi T, Fujiki H, Yoshida T, Okuda T, Sugimura T. Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "Tannin" in green tea. *Phytotherapy Res.* 1: 44-47 (1987)
23. Kim MH, Kwak HJ, Yoo BH, Kim DJ, Yoon SJ. Quality characteristics and antioxidant effects of grape juice obtained with different extraction methods. *Korean J. Food Preserv.* 20: 784-790 (2013)
24. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 233-240 (2005)
25. Liu F, Ng T. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sci.* 66: 725-735 (2000)
26. Wojdyło A, Oszmiaski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105: 940-949 (2007)
27. Cho EK, Yoo SK, Choi YJ. Inhibitory effects of maesaengi (*Capsosiphon fulvescens*) extracts on angiotensin converting enzyme and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Life Sci.* 21: 811-818 (2011)
28. Jeon SM, Lee JY, Kim HW, Lee YM, Jang HH, Hwang KA, Kim HR, Park DS. (2012). Antioxidant activity of extracts and fractions from *Aster scaber*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1197-1204 (2012)
29. Kim DJ, Jung, JH, Kim SG, Lee HK, Lee SK, Hong HD, Lee BY, Lee OH. Antioxidants and anti-obesity activities of hot water and ethanolic extracts from Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J. Food Preserv.* 18: 366-373 (2011)
30. Shimada M, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 40: 945-948 (1992)
31. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* 309: 189 (1977)
32. Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem. Analysis* 19: 411-419 (2008)
33. Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, Ko SC, Han JS, Jeon YJ. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase *in vitro* and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chem. Toxicol.* 48: 2633-2637 (2010)
34. Lee YS, Choi JB, Joo EY, Kim NW. Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1113-1119 (2007)
35. Lee SH, Kim SY, Kim JJ, Jang TS, Chung SR. The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*. *Korean J. Pharmacogn.* 30: 397-403 (1999)