J Appl Biol Chem (2017) 60(3), 241–244
https://doi.org/10.3839/jabc.2017.038

Online ISSN 2234-7941
Print ISSN 1976-0442

Note: Food Science/Microbiology

In vitro antioxidant property and α-glucosidase and pancreatic lipase inhibiting activities of Jeju camellia mistletoe (*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.) extracts

Eun Mi Park[1] · Min Young Kim[1]

제주 동백나무 겨우살이(*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.)의 항산화 및 α-glucosidase와 pancreatic lipase 저해 활성

박은미[1] · 김민영[1]

Received: 11 June 2017 / Accepted: 8 August 2017 / Published Online: 30 September 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract The antioxidant activity of various solvent extracts from Jeju camellia mistletoe (*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.) was investigated using various *in vitro* assays as the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging, ferrous ion chelating and reducing power assays. Methanol and ethanol extracts showed the most potent antioxidant activity in all assays tested followed by water extract. The inhibitory effect of the Jeju camellia mistletoe extracts on pancreatic lipase and á-glucosidase was also evaluated and the results showed that methanol and ethanol extracts markedly reduced both enzyme activities. Therefore, the methanol and ethanol extracts of Jeju camellia mistletoe is definitely worthy of further investigation for these beneficial effects on nutraceutical medicine.

Keywords Antioxidant · α-Glucosidase inhibition · Jeju camellia mistletoe · Pancreatic lipase inhibition

Min Young Kim (✉)
E-mail: jeffmkim@jejunu.ac.kr

[1]Toxicology Laboratory, Major in Biomaterials, SARI, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

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.

서 론

생체는 필수적으로 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 물질 대사와 에너지를 생산하지만, 산화촉진물질과 산화억제물질의 균형이 무너지면 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 과잉 발생으로 산화적 스트레스(Park 등, 2006; Kim 등, 2014)로 인한 면역력 저하, DNA 손상, 장기 및 조직 손상을 비롯한 각종 질병을 야기시킨다(Lee 등, 2010). ROS가 유발하는 노화 및 성인병 등의 손상을 억제하기 위한 항산화 물질로서 butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate와 같은 합성 항산화제가 많이 사용되어 왔으나 이들을 고용량으로 장기간 복용 시 세포독성을 나타내거나 암을 유발시킬 수 있으므로, 이러한 합성 항산화제를 대체할 수 있는 안전하고 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Lee 등, 2010; Jeon 등, 2011).

한편, 이러한 항산화 체계의 불안전성으로 유발되는 질병 중 당뇨병은 현대인에 있어서 가장 흔한 내분비계 장애질환으로 최근 연구에서 당뇨병 병인 중 하나인 췌장 β 세포의 기능장애가 산화적 스트레스에 의해 발생하는 것이 밝혀졌다(David A 2013). 현재 시판되고 있는 당뇨 치료 α-glucosidase inhibitor 약물은 장기 복용할 경우 복부팽만감, 구토, 설사 등 부작용이 나타날 수 있어(Tsujimoto 등, 2008), 보다 안전하며 혈당조절 효능이 우수한 천연물을 찾기 위한 지속적인 탐색연구가 진행되고 있다.

비만은 에너지 불균형에 의한 대사이상으로 고혈압 및 고지혈증, 제 2형 당뇨병, 심장질환, 뇌졸중, 관절염, 동맥경화, 암, 대사증후군, 수면무호흡증, 관절염, 요통 등의 만성질환과 밀접한 연관이 있다(Sjöström 1992). 최근 비만의 치료와 예방에 있어 key enzyme으로 작용하는 지방분해효소인 pancreatic lipase

의 작용을 억제하는 방법이 주목을 받고 있음에 따라(Bitou 등, 1999), 천연소재로부터 pancreatic lipase 저해제 개발을 위한 연구가 활발하게 진행 되고 있다(Yamamoto 등, 2000).

겨우살이는 여러 나무를 숙주로 하여 자체적인 광합성 능력을 지니는 반기생식물이자 약용식물로(Yoon 등, 2009; Kwon 등, 2012), 최근 많은 연구논문을 통해 항고혈압, 항당뇨, 항균, 항바이러스, 면역력 증강, 항암 효능이 밝혀졌다(Ju 등, 2009; Lee 등, 2010). 우리나라에는 단향과의 겨우살이, 붉은 겨우살이, 동백나무 겨우살이, 꼬리 겨우살이와 참나무 겨우살이 등 2과 4속 5분류군이 분포하고, 유럽산 겨우살이와는 달리 특유의 alkaloid를 함유하고 있어 상대적으로 높은 항암 활성을 가지는 것으로 보고되었다(Ju 등, 2009; Yoon 등, 2009; Lee 등, 2010). 이처럼 겨우살이에 대한 활발한 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 제주도와 남해안 등 일부 지역에서만 서식하고 있는(Choi 2009) 동백나무 겨우살이에 대한 성분 및 생리학적 활성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 제주산 동백나무 겨우살이의 *in vitro* 산화방지 활성, α-glucosidase와 pancreatic lipase 저해 활성을 측정하여 천연 항산화제 및 기능성 식의약품 소재화 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시료

실험에 이용된 동백나무 겨우살이는 제주특별자치도 서귀포시 안덕면에 위치한 카멜리아 힐에서 2016년 8월 채집하여 사용하였으며, 건조 후 마쇄한 뒤 무게당 약 5배의 메탄올과 70% 에탄올을 가하여 25 ºC에서 150 rpm으로 72시간 교반하면서 유효성분을 추출하였다. 열수 추출물의 경우 autoclave를 이용하여 121 ºC, 15분 동안 유효성분을 추출하였다. 각 용매 추출물은 filter paper로 여과하여 감압농축 한 뒤 동결건조한 것을 Dimethyl sulfoxide에 녹여 사용하였다.

DPPH radical 소거능, Ferrous ion chelating 활성 및 환원력 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 소거 활성 방법(Kang과 Kim 2015)은 96-well plate에 농도별 시료 100 μL를 넣고 0.4 mM DPPH 100 μL를 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응 시킨 다음 microplate reader (Spectra MR, Dynex, VA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferrous ion chelating 활성(Kang 등, 2016)은 시료 250 μL에 2 mM Ferrous chloride (Iron (II) chloride, $FeCl_2$) 5 μL와 5 mM 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate (Ferrozine) 10 μL를 순서대로 넣고, 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원력(Kang과 Kim 2015)은 시료 200 μL를 e-Tube에 넣고 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 200 μL와 1% potassium ferricyanide 200 μL를 넣은 다음 50 ºC에서 20분간 반응시켰다. 10% Trichloroacetic acid 200 μL를 첨가하여 반응을 정지시키고, 상층액 100 μL를 96-well plate로 옮겨 0.1% Ferric chloride 20 μL와 distilled water 100 μL를 순서대로 첨가한 혼합액의 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. 시료의 농도별 흡광도는 시료 무첨가군과 흡광도 차이를 통해 흡광도를 계산하였고, DPPH 소거능이나 chelating 활성이 50%에 도달하는 농도(IC_{50}) 또는 환원력 시험의 OD값이 0.5에 도달하는데 필요한 유효농도($IC_{0.5}$)를 계산하여 용매 및 농도에 따른 항산화능을 비교하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid과 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 활용하여 동백나무 겨우살이 추출물의 항산화능을 비교분석하였다.

α-Glucosidase 억제 활성

α-Glucosidase 저해활성(Lee 등, 2015)은 농도별 시료에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 10 μL 넣고 모든 well에 2 U/mL α-glucosidase 50 μL와 5 mM ρ-nitrophenol-α-D-glucopyranoside 50 μL를 첨가 후 5분간 실온에서 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Pancreatic lipase 저해 활성

Pancreatic lipase 저해활성 측정은(Kwon 등, 2014) 96-well plate에 enzyme buffer (10 mM MOPS, 100 mM EDTA, pH 6.8)를 용매로 하여 녹인 10 mg/mL Porcin pancreatic lipase 6 μL와 Tris buffer (100 mM Tris, 5 mM $CaCl_2$, pH 7.0) 170 μL, 농도별 시료 20 μL를 순서대로 첨가하여 37 ºC에서 15분간 반응시켰다. 반응 시간이 지나면 10 mM p-nitriphenyl butyrate 4 μL를 첨가하여 37 ºC 인큐베이터에서 60분간 반응시킨 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 처리

모든 실험 결과는 3회 반복 측정 후 평균값과 그의 표준편차를 나타내었다. 각 실험군의 항산화, 알파-글루코시데이즈와 췌장리파아제 저해 활성활성 비교는 $p<0.05$ 수준에서 Student's *t*-test로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

겨우살이는 과거 수세기 동안 민간요법의 각종 치료제로서 사용되어 왔는데 유럽에서는 고혈압 및 암과 같은 질병의 치료를 위해 건강식품이나 의약품의 형태로 가공되어 판매되고 있으며, 우리나라에서도 민간 및 한방에서 진정, 요통, 치통, 당뇨, 동맥경화증, 고혈압, 유산 및 해산 후 출혈의 방지, 그리고 종양의 제거 등의 용도로 이용되어 왔다(Ju 등, 2009; Lee 등, 2010). 주로 제주도와 전라남도 지방에 분포하는 동백나무 겨우살이는 일반 겨우살이보다 3-4배 높게 가격이 형성되어 그 가치를 인정받고 있는 고부가가치 소재이지만 제주산 동백나무 겨우살이 특유의 효능에 대한 연구는 아직 미흡한 상황이다. 이에 본 실험에서는 제주지방에서 자라는 동백나무 겨우살이의 항산화 활성, α-glucosidase 및 pancreatic lipase 활성 억제 효능을 확인하고 비교함으로써 제주산 동백나무 겨우살이의 활용가능성을 검토하고 활용범위를 넓히고자 본 실험을 진행하였다.

먼저 동백나무 겨우살이의 산화기전 억제효과를 확인하기 위해 DPPH radical 소거능, ferrous ion chelating 및 환원력을 측정하였으며, 모든 결과는 절반의 소거활성을 나타내는 유효농

Table 1 Antioxidant activity of methanol, ethanol and water extracts of Jeju camellia mistletoe (*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.)

Antioxidant activities	IC_{50} values (mg/mL)		$IC_{0.5}$ values (mg/mL)
	DPPH free radical scavenging activity	Ferrous ion chelating activity	Reducing power
Methanol	0.9±0.002[a]	0.4±0.0004[a]	1.0±0.01[a]
70% Ethanol	1.2±0.02[a]	0.3±0.01[b]	1.1±0.01[b]
Hot water	2.5±0.47[b]	0.3±0.01[b]	2.9±0.01[c]

[1)] IC_{50} and $IC_{0.5}$ values represents the extracts concentration needed to reduce 50% of the initial antioxidant concentration
[2)] Values are means ± SD (n =3)
[3)] Different superscripts ([a-c]) with column indicate significant differences at p <0.05 by Student's t-test

도(IC_{50})로 계산하여 나타내었다(Table 1). 제주 동백나무 겨우살이의 DPPH free radical에 대한 소거능은 IC_{50} 값이 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid (0.4 mg/mL) 보다 다소 낮은 메탄올(0.9 mg/mL), 에탄올(1.2 mg/mL), 열수(2.5 mg/mL) 추출물 순으로 활성이 높게 측정되어 통계적 유의차를 보였다(p < 0.05)(Table 1). 본 실험의 활성과 마이크로웨이브 추출방법을 이용한 참나무 겨우살이의 DPPH radical 소거능 양상은 유사하게 관찰되었으나 에탄올 추출물(IC_{50}=18.1 g/mL)과 비교 결과 동백나무 겨우살이 추출물의 활성이 월등히 높았다(Lee 등, 2011). 또한 2015년 5월에 채집한 동백나무 겨우살이(Kang 등, 2016) 보다 8-11배 가량 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었는데, 이는 시료의 추출용매, 추출방법 및 겨우살이 숙주의 차이에 따른 것으로 판단된다. 다음으로 용매별 동백나무 겨우살이 추출물의 ferrous ion chelating 활성을 측정한 결과는 농도가 증가함에 따라 chelating 활성이 증가하는 양상을 보였으나 각 농도별 용매에 따른 환원력의 차이가 크게 나타나지 않았다(Table 1). IC_{50} 값을 통해 용매 간의 활성을 비교분석한 결과 메탄올, 에탄올 및 열수 추출물은 각각 0.4, 0.3, 0.3 mg/mL 로 에탄올과 열수 추출물이 다소 높은 chelating 활성을 나타냈다(p < 0.05)(Table 1). 숙주 식물에 따른 겨우살이의 항산화 효능에 관한 연구에서 아프리카 겨우살이(*Loranthus bengwensis* L) 중 아몬드나무 겨우살이 열수 추출물(0.36 mg/mL) (Oboh 등, 2016)이 본 연구에서의 chelating 활성과 비슷한 반면 빵나무 겨우살이(2 mg/mL)나 코코넛나무 겨우살이(2.2 mg/mL)(Oboh 등, 2014)는 그 활성이 낮게 나타났는데, 이는 겨우살이의 기생 숙주의 종의 차이와 서식지의 환경에 따른 차이에 따른 것으로 기인된다. 뿐만 아니라 2015년 5월에 채집한 동백나무 겨우살이(Kang 등, 2016)에서도 본 연구와 유사하게 에탄올 추출물에서 다소 높은 활성을 나타내었다. 마지막으로 동백나무 겨우살이의 환원력을 측정한 결과, 양성대조군으로 사용한 L-ascorbic acid의 흡광도 값(0.68)과 동일 농도(1 mg/mL)에서 비교하였을 때 추출물의 환원력(0.2-0.47)이 다소 낮게 나타났다. 흡광도 값이 0.5에 도달하기 위해 유효한 농도인 $IC_{0.5}$로 나타내었을 때 각 추출물들의 $IC_{0.5}$은 메탄올(1.0 mg/mL) 에탄올(1.1 mg/mL), 열수(2.9 mg/mL) 추출물 순으로 통계적인 유의차를 나타내었다(p <0.05)(Table 1). 이는 2015년 5월에 채집한 동백나무 겨우살이(Kang 등, 2016)보다 15배 가량 높은 활성 결과를 보인 것으로, 가장 높은 활성을 보인 메탄올 추출물의 경우 0.5 mg/mL에서 0.34의 흡광도를 보여 동일 농도에서 0.11의 흡광도 값을 보인 인도 겨우살이(*Viscum nepalense* Sprengel) (Murali 등, 2011) 메탄올 추출물보다 3배 가량 높은 환원력 결과를 보였다.

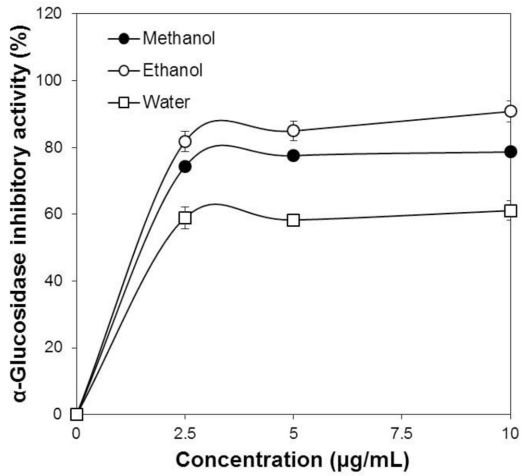

Fig. 1 Antidiabetes activity of methanol (closed circle), ethanol (open circle) and water (open square) extracts of Jeju camellia mistletoe (*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.) α-Glucosidase inhibitory assay was carried our according to concentration dependent manner Values are means and SD of triplicate analyses

본 연구에 나타난 전체적인 항산화 활성은 같은 나무에서 2015년 5월에 채집한 동백나무 겨우살이(Kang 등, 2016)보다 상당이 높은 활성을 나타내었는데 이러한 차이는 샘플의 농축과정 유무에 따른 것으로 사료된다.

본 연구에서 동백나무 겨우살이 추출물은 농도의존적으로 반응시간 증가에 따라 α-glucosidase의 활성저해 효과가 상승하는 것이 관찰되었는데 세 가지 용매 추출물 중에서 에탄올 추출물(IC_{50}=2.5 μg/mL)의 α-glucosidase 저해 활성이 가장 높게 나타났고, 그 다음 메탄올 추출물(IC_{50}=3.25 μg/mL), 열수 추출물(IC_{50}=6.1 μg/mL) 순으로 통계적인 유의차를 보였다(Fig. 1). 이 결과는 인도네시아의 여러 나무를 기주목으로 한 겨우살이(*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) 추출물 보다 높은 활성을 나타내는 것으로(Artanti 등, 2012) 향후 유효성분 분리에 관한 추가연구의 가치가 높음을 시사한다. 또한, 항비만 소재로의 가능성을 알아보기 위하여 동백나무 겨우살이 추출물에 대하여 pancreatic lipase를 이용한 실험을 수행하였다. 그 결과 에탄올 및 열수 추출물의 지방분해효소 저해능은 500 μg/mL 농도에서 각각 59.2, 58.1, 20.6%의 저해활성을 나타내었으나(Fig. 2), 꼬리겨우살이를 대상으로 한 기존의 결과(Lee 등, 2012)보다 낮은 활성을 보이는 것으로 나타났다.

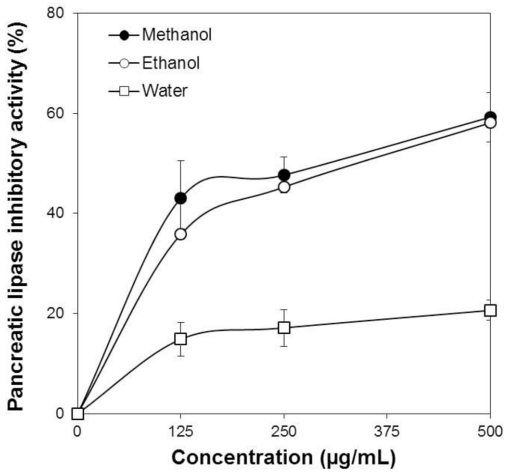

Fig. 2 Inhibitory effects of methanol (closed circle), ethanol (open circle) and water (open square) extracts of Jeju camellia mistletoe (*Korthalsella japonica* (Thunb.) Engl.) against pancreatic lipase Values are means and SD of triplicate analyses

초 록

제주 동백나무 겨우살이 추출물의 항산화 활성을 DPPH 라디컬 소거능, 철이온 킬레이팅과 환원력 시험을 통해 조사한 결과, 메탄올과 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 뛰어난 항산화 효능을 보였다. α-Glucosidase와 pancreatic lipase 저해능 또한 메탄올과 에탄올 추출물이 우수한 활성을 보였다. 따라서, 제주 동백 나무 겨우살이의 메탄올 및 에탄올 추출물을 건강기능 의약식품 소재로 개발하기 위한 추가 연구가 진행되어야 할 것이다.

Keywords 제주 동백나무 겨우살이·항산화 활성·α-Glucosidase 저해 활성 · Pancreatic lipase 저해 활성

감사의 글 이 논문은 2014년(NRF-2014R1A1A2056292)과 2016년도(2016R1A6A1A03012862) 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구사업임.

References

Artanti N, Firmansyah T, Darmawan A (2012) Bioactivities evaluation of Indonesian mistletoes (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) leaves extracts. J Pharmaceuti Sci 2: 24

Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H (1999) Screening of lipase inhibitors from marine algae. Lipids Heidelberg 34: 441–445

Choi OB (2009) The importance of clinical mistletoe cancer therapy and korean mistletoe pharmacopuncture preparation development and application possibility for oriental medicine. J Pharmacopuncture 12: 77–89

David A TF (2013) NOX, NOX who is there? The contribution of NADPH oxidase one to beta cell dysfunction. Front Endocrinol 4: 40

Jeon YH, Won JH, Kwon JE, Kim MR (2011) Antioxidant activity and cytotoxic effect of an ethanol extract from *Seoritae*. Korean J Food Cookery Sci 27: 1–10

Ju MJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2009) Physiological activities of mistletoe extracts from *Viscum album* L. J Korean Soc Food Sci Nutr 38: 529–534

Kang DH, Kim MY (2015) Comparative phenolic composition and antioxidant properties of Honey and Honeycomb extracts. J Life Sci 25: 1169–1175

Kang DH, Park EM, Kim JH, Yang JW, Kim JH, Kim MY (2016) Bioactive compounds and antioxidant activity of Jeju Camellia Mistletoe (*Korthalsella japonica* Engl.). J Life Sci 26: 1074–1081

Kim JW, Moon JS, Choe TB (2014) Comparison of antioxidant activity of Kenaf extract and its flavonoids. Korean J Aesthet Cosmetol 12: 203–210

Kwon OJ, Lee HY, Kim TH, Kim SG (2014) Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of *Anemarrhena asphodeloides.* Korean J Food Preserv 21: 421–426

Kwon SM, Jang JH, Kim CW, Kim KM, Yi JS, Kim NH (2012) Anatomical characteristics of Korean Mistletoe (*Viscum album var. coloratum*). J Korean Wood Sci Tech 40: 268–275

Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2010) Antioxidant effects of *Viscum album* L. extracts by extraction conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr 39: 14–19

Lee HJ, Do JR, Kwon JH, Kim HK (2011) Physiological properties of oak mistletoe (*Loranthus yadoriki*) extracts by microwave extraction condition. Korean J Food Preserv 18: 72–78

Lee JE, Kim JH, Kim MY (2015) Changes in phenolic composition, antioxidant and antidiabetic properties of Jeju *Citrus sudachi* as influenced by Maturity. J Life Sci 25: 1311–1318

Lee YM, Kim YS, Lee Y, Kim J, Sun H, Kim JH, Kim JS (2012) Inhibitory activities of pancreatic lipase and phosphodiesterase from Korean medicinal plant extracts. Phytother Res 26: 778–782

Murali M, Puneetha GK, Thriveni MC, Niranjan MH, Shivamurthy GR, Niranjana SR, Prakash HS, Amruthesh KN (2011) Phytochemical screening and antioxidant activity of hemi-parasitic Indian mistletoe *Viscum nepalense* Sprengel. J Pharm Res 4: 3348–3350

Oboh G, Babatola LJ, Ademiluyi AO (2014) Antioxidant properties of phenolic extracts of African Mistletoes (*Loranthus begwensis L.*) from Kolanut and Breadfruit Trees. J Food Sci Quality Manage 32: 6–11

Oboh G, Omojokun OS, Ademiluyi AO (2016) Drying methods alter angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity, antioxidant properties, and phenolic constituents of African Mistletoe (*Loranthus bengwensis* L) Leaves. J Evid Based Complemen Altern Med 21: 260–270

Park DH, Jeong GT, Lee GM (2006) Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. Korean Chem Eng Res 44: 81–86

Sjöström L (1992) Morbidity of severely obese subjects. J Clin Nutr 55: 508S–515S

Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Mitoro A, Yamao J-i, Fujii H, Fukui H (2008) Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. World J Gastroenterol 14: 6087–6092

Yamamoto M, Shimura S, Itoh Y, Ohsaka T, Egawa M, Inoue S (2000) Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, Nomame Herba, on rats fed a high-fat diet. J Obes 24: 758

Yoon TJ, Yang WS, Park SM, Jung HY, Lee AN, Jung JH, Kang TB, Yoo YC, Kim JB (2009) *In vivo* toxicity and immunoadjuvant activity of Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract fermented with *Lactobacillus*. Korean J Food Sci Technol 41: 560–565