

## 트립신 처리에 따른 적송잎 추출물의 항산화 활성 및 항균 효과

문기은\* · 박교현\* · 이범주\*\* · 김배환\*†

\*계명대학교 자연과학대학 공중보건학과, \*\*(주)케미랜드

### Antioxidant and Antimicrobial Activities of Trypsin-treated *Pinus densiflora* Ethanol Extract

Ki-Eun Moon\*, Kyo-Hyun Park\*, Beom Zoo Lee\*\*, and Bae-Hwan Kim\*†

\*Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University

\*\*CHEMLAND Co., Ltd.

#### ABSTRACT

**Objectives:** We investigated the antioxidant and antibacterial activities of *Pinus densiflora* ethanol extracts (PDEE) treated with trypsin as a protease.

**Methods:** Various antioxidant activities were evaluated by measuring total contents of polyphenol and flavonoid, DPPH electron-donating ability and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of test material. To compare the antibacterial activity, paper disc diffusion assay was performed against two resident bacteria in human skin (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*).

**Results:** As for the total contents of polyphenol and flavonoid, and the electron-donating ability and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity, both PDEE and trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract (T-PDEE) showed high antioxidant activity in dose-dependent manner. And the T-PDEE showed slightly higher activity than PDEE, which indicated protease treatment seemed to affect in antioxidant activity. In the result of paper disc diffusion assay, antibacterial activity was confirmed in all two types of skin resident bacteria. T-PDEE was more active than PDEE and it seems that treatment of protease may increase the antibacterial activity of PDEE.

**Conclusion:** All of these results, we confirmed that treatment of protease to PDEE can increase the antioxidant and antibacterial activities, and it can be explained thought that this would be applicable as a cosmeceutical material in the future.

**Keywords:** Antibacterial activity, Antioxidant, *Pinus densiflora*, Protease, Trypsin

## I. 서 론

최근 식품, 의약 및 화장품 산업에서 특정 성분을 강화시키고 유용성분의 추출 수율을 높여 생리활성을 향상시키기 위해 천연 원료에 효소를 처리하는 방법이 활발하게 연구되어지고 있다. 효소처리란 동물, 식물 및 미생물에서 기원한 효소를 농축, 추출, 정제 발효 등의 과정을 통해 큰 단위의 특정 성분

을 작은 단위로 분해하는 방법을 의미한다.<sup>1)</sup> 권상철 등(2010)의 연구에서는<sup>2)</sup> 효소를 첨가한 황기 추출액의 수율과 생리적 기능성이 향상되었고 박민경(2011)의 연구에서는<sup>3)</sup> 단백질 분해효소 처리가 청국장장의 펩타이드 생성 및 항산화 활성 증가에 효율적임을 확인할 수 있었다. 이와 같이 생리활성을 증가하기 위한 방법으로서 효소의 처리는 응용이 범위가 넓은 것으로 보여진다.

†Corresponding author: Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea, Tel/Fax: +82-53-580-5933, E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

Received: 28 March 2018, Revised: 24 April 2018, Accepted: 20 June 2018

단백질에 직접 작용하여 펩티드 결합을 가수분해하는 대표적인 단백질 분해효소인 trypsin은 췌장에서 trypsinogen 형태로 만들어져 소장으로 운반되어 enterokinase 또는 trypsin 자체에 의해 활성화되어 단백질을 분해한다.<sup>4)</sup>

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)는 사람의 피부와 점막에 주로 분포하는 포도송이 모양을 가진 그람양성구균으로, 피부감염, 창상감염, 결막염, 식중독 등을 유발하기 때문에 화장품에서 검출되어서는 안 되는 병원균이다.<sup>5)</sup> *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)는 건강한 피부에서는 pH를 유지하며 인체에 유해한 세균의 생장을 방어해주지만 과잉 생장 시 여드름을 악화시키고 피부를 감염시키는 그람양성구균이다.<sup>6)</sup> 이러한 균은 피부 노출 시 다양한 질환을 유발할 수 있으므로 화장품과 같은 신체에 사용되는 다양한 생활용품의 사용 시 주의하여야 한다. 균의 생장을 억제하는 것을 항균력라고 하며, 항균력의 종류로는 세포벽의 합성을 저해하거나 단백질 합성저해, 핵산의 합성저해 등으로 분류할 수 있다.<sup>7)</sup>

한국에 널리 분포되어 있는 대표적인 소나무인 적송은 상록침엽 교목으로 학명은 *Pinus densiflora* Siebold & Zucc.이며, 우리나라를 비롯하여 중국 및 일본 등의 동아시아에서 자생한다. 예로부터 소나무의 목피, 잎, 송진, 솔방울, 꽃가루 등 모든 부위를 이용하여 음식에 첨가하거나 약용 및 건강식품으로 이용하는 등 응용가치가 높은 천연물로 알려져 있다.<sup>6,8)</sup> 적송은 단백질 구성 아미노산 16종을 풍부하게 함유하며 그 중 필수 아미노산 8종을 포함하고 있어 성장과 혈액순환 및 신진대사를 촉진하고 호르몬 분비를 왕성하게 한다.<sup>9)</sup> 소나무잎의 주요성분은 quercetin, kaempferol 등의 flavonoid류,  $\alpha$ -oienene,  $\beta$ -pinene, camphene 등의 정유 성분 및 수지, 당류, 카로틴, 비타민 C 등이 있다.<sup>10)</sup> 소나무잎의 생리활성 관련 연구에는 항산화, 항균, 항염증, 항암, 호르몬 분비 촉진 등에 관한 연구가 보고되어 있다.<sup>11,12,13,14)</sup> 특히, 적송의 주요성분인 proanthocyanidin은 flavonoid 성분의 일종으로 비타민 C, E보다 radical 소거능 및 산화적 조직손상억제가 우수한 것으로 보고되어 있다.<sup>15)</sup>

적송의 생리활성능에 대해서는 다양한 연구가 보고되어 있지만, 이미 보고되어진 생리활성능을 증가시키는 연구는 아직 미비하다. 새로운 효능 물질을 탐색하는 것도 좋지만, 이미 효능이 검증된 물질에 공

정을 추가하여 그 효능을 극대화 시킨다면 좀더 효율적으로 기능성 원료를 개발할 수 있을 것으로 예상되어진다. 이에 본 연구는 단백질 분해효소인 trypsin이 적송잎 에탄올 추출물(*Pinus densiflora* ethanol extract, PDEE)의 항산화 및 항균활성 증가에 미치는 영향을 확인하여 그 응용가능성을 제시하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

실험에 사용된 Folin & Ciocalteu's phenol reagent, diethylene glycol, tannic acid, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis diammonium salt (ABTS) 등의 시약은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Nutrient agar, nutrient broth, tryptic soy agar 및 tryptic soy broth 등의 배지는 Difco Lab (Sparks, USA)의 제품을 사용하였다. 그 외의 일반 시약들은 특급품을 사용하였다.

실험에 사용된 실험기기는 spectrophotometer (Epoch, Bio Tek, USA), 전자저울(XT220A, Precisa, Swiss), clean bench (DBB-922, Daeil, Korea), incubator (MIR-162, SANYO, Japan)이고 그 외 기기들은 실험실에서 사용하는 일반기기를 이용하였다.

### 2. 실험물질

본 연구에서 사용된 시료는 강원도 삼척시에서 자생하는 금강송에서 채취한 적송(*Pinus densiflora* Siebold & Zucc.)잎을 구입하여 사용하였다. 적송잎 에탄올 추출물은 시료 중량대비 10배의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 교반하여 상등액과 침전물을 분리한 후 여과 및 농축을 진행하여 얻었다. 적송잎 에탄올 추출물에 trypsin을 처리하기 위해 trypsin을 적송잎 원물 중량대비 5%의 양으로 실온에서 15분간 처리하였다. 이후 80°C에서 1시간 동안 가열하여 trypsin을 불활성화 하였다. 적송잎 에탄올 추출물(*Pinus densiflora* ethanol extract, PDEE)과 단백질 분해효소인 trypsin을 처리한 적송잎 에탄올 추출물(Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract, T-PDEE)은 동결 건조하여 추출된 유효성분의 수율을 측정된 뒤 -20°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

### 3. Total polyphenol contents

실험물질의 총 폴리페놀 함량은 Folin and Denis 법(1912)<sup>16)</sup>에 의거하여 측정하였다. 실험물질은 200 µg/mL의 농도로 제조하여 Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 동량 혼합 후 증류수 7.5 mL을 균질하게 혼합하여 3분간 방치하였다. 혼합 용액에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 1 mL을 첨가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 정량화하였다.

### 4. Total flavonoid contents

실험물질의 총 플라보노이드 함량은 Davies 등 방법(1980)<sup>17)</sup>에 의거하여 측정하였다. 실험물질은 200 µg/mL의 농도로 제조하여 시료 용액 200 µL에 diethylene glycol 2 mL을 균질하게 혼합하여 5분간 방치하였다. 1 N NaOH 용액 200 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 420 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 정량화하였다.

### 5. DPPH 전자공여능

실험물질의 전자공여능(electron-donating ability, EDA)은 Blois법(1958)<sup>18)</sup>에 의거하여 측정하였다. 실험물질은 1,000 µg/mL에서 5개의 농도로 희석하여 시료 용액 100 µL에 0.2 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액을 50 µL 넣고 실온, 암실에서 30분간 반응시켰다. Spectrophotometer를 이용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. ABTS<sup>+</sup> radical 소거능

실험물질의 ABTS<sup>+</sup> free radical 소거능은 Re 등 방법(1999)<sup>19)</sup>에 의거하여 ABTS<sup>+</sup> radical cation decolorization assay로 측정하였다. 7 mM 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium

salt와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 실온, 암실에서 12시간 방치하여 ABTS<sup>+</sup> free radical을 생성시켰다. 그 후 ethanol로 희석하여 734 nm 파장에서 흡광도 값이 0.7 (±0.02)이 되도록 하였다. 실험물질은 1,000 µg/mL에서 5개의 농도로 희석하여 시료 용액 100 µL와 ABTS<sup>+</sup> 용액 100 µL를 혼합하여 7분 동안 암실에 반응시키고 spectrophotometer를 이용하여 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. 항균 활성

### 7.1. 사용 균주 및 배지

항균 효능 평가에 사용된 피부상재균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 제공받아 37°C의 조건에서 Table 1과 같이 배양하였다. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)는 nutrient agar에 배양하고 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)는 trypticase soy agar 배지를 이용하여 배양하였다.

### 7.2. Paper disc diffusion assay

실험물질의 항균 활성은 paper disc diffusion assay를 이용하여 측정하였다. 1×10<sup>7</sup> CFU/mL로 조절된 균액을 한천배지에 100 µL씩 균일하게 도말하였다. 직경 8 mm의 멸균된 paper disc (ADVANTEC, Japan)를 균액이 도말된 한천배지에 올려두고 음성대조군인 증류수와 농도별로 희석된 실험물질을 20 µL씩 흡수시켰다. Dish를 뒤집어 37°C incubator에서 24시간 배양시켰다. 그 후 paper disc 주변에 생성된 생육저해환(clear zone)의 직경(mm)을 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

## 8. 통계처리

본 실험의 결과는 반복 수행결과의 평균값과 표준편차로 나타내었으며, SPSS 21.0 for windows (SPSS Inc., USA) 통계프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 실시하였다. 분석결과 검증을 위하여 Duncan's multiple range test를 이용

**Table 1.** List of bacteria for antibacterial activity test

Type	Bacterial strain	KCTC No.	Liquid culture medium	Solid culture medium
Gram-positive	<i>S. aureus</i>	KCTC 1621	Nutrient broth	Nutrient agar
	<i>S. epidermidis</i>	KCTC 1917	Trypticase soy broth	Trypticase soy agar

하였으며, 통계학적인 유의성 검증은  $p < 0.05$ 의 수준으로 하였다.

### III. 결 과

#### 1. Yields of products

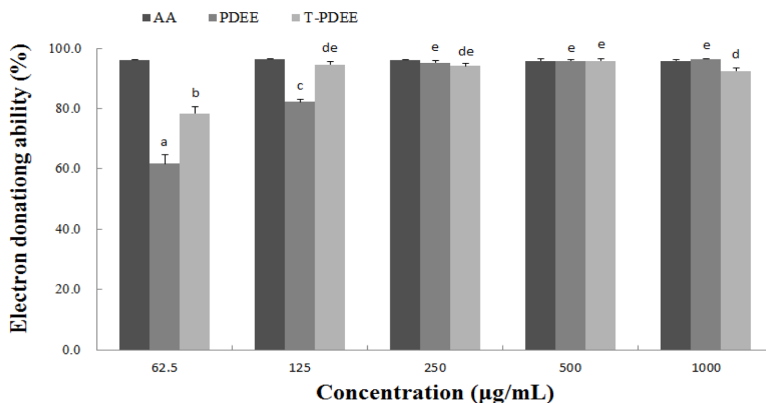
PDEE와 T-PDEE의 수율은 Table 2와 같다. PDEE와 T-PDEE의 수율은 4.2%, 14.8%로 trypsin에 의해 수율이 약 3배 이상 증가되었다.

#### 2. Total polyphenol and flavonoid contents

PDEE와 T-PDEE의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 Table 3과 같다. 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 PDEE에서 73.7 mg/g, T-PDEE에서 100.0 mg/g로 나타났고 총 플라보노이드 함량에서는 PDEE에서 30.0 mg/g, T-PDEE에서 67.6 mg/g으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 모두 단백질 분해효소인 trypsin을 처리한 T-PDEE에서 더 높은 함량을 확인할 수 있었다.

#### 3. DPPH 전자공여능

PDEE와 T-PDEE의 항산화 활성 평가를 위해 DPPH 전자공여능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 PDEE는  $96.4 \pm 0.2\%$ , T-PDEE는  $96.6 \pm 0.6\%$ 로 나타나 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid의 전자공여능과 비슷한 활성이 나타나 항산화 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 1.** Electron-donating ability of PDEE and T-PDEE. Values represent the mean $\pm$ SD of 3 independent measurements. Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). AA: Ascorbic acid. PDEE: *Pinus densiflora* ethanol extract. T-PDEE: Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract.

**Table 2.** Yields of PDEE and T-PDEE

Extracts	Yields (%)
PDEE <sup>1)</sup>	4.2
T-PDEE <sup>2)</sup>	14.8

<sup>1)</sup>PDEE: *Pinus densiflora* ethanol extract.

<sup>2)</sup>T-PDEE: Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract.

**Table 3.** Total polyphenol and flavonoid contents of PDEE and T-PDEE

	PDEE <sup>1)</sup>	T-PDEE <sup>2)</sup>
Total polyphenol contents (mg/g)	73.3 $\pm$ 1.2	100.0 $\pm$ 1.6
Total flavonoid contents (mg/g)	30.0 $\pm$ 0.7	67.6 $\pm$ 2.6

Values are mean $\pm$ SD of 3 measurements.

<sup>1)</sup>PDEE: *Pinus densiflora* ethanol extract.

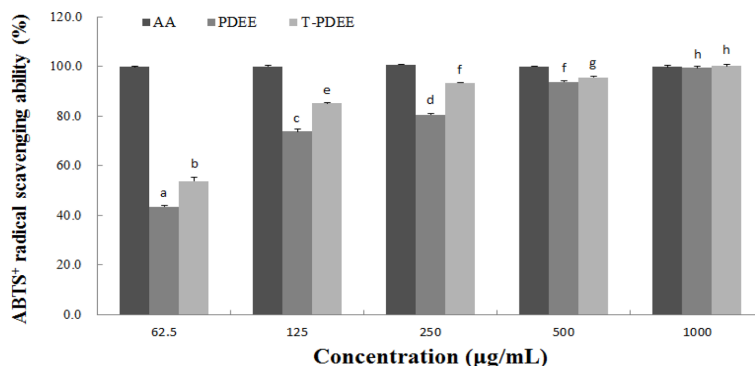
<sup>2)</sup>T-PDEE: Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract.

#### 4. ABTS<sup>+</sup> radical 소거능

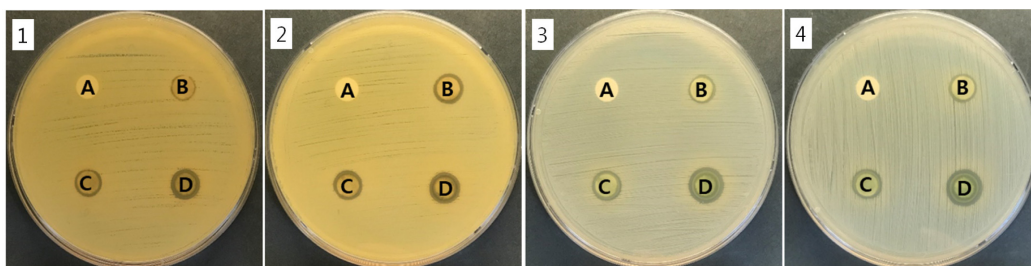
PDEE와 T-PDEE의 항산화 활성 평가로 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 PDEE는  $99.4 \pm 0.5\%$ , T-PDEE는  $100.2 \pm 0.8\%$ 로 나타났다. 또한 시료의 농도증가에 따라 radical 소거능이 증가하는 양상을 보였으며 trypsin을 처리한 T-PDEE가 더 높은 활성을 나타냈다. 이와 같은 결과에 따라 PDEE보다는 trypsin을 처리한 T-PDEE가 응용가능성이 더 높을 것으로 보인다.

#### 5. 항균 활성

항균 활성 결과는 Fig. 3과 Table 4와 같다. *S.*



**Fig. 2.** ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of PDEE and T-PDEE. Values represent the mean±SD of 3 independent measurements. Values with different letters are significantly different (p<0.05). AA: Ascorbic acid. PDEE: *Pinus densiflora* ethanol extract. T-PDEE: Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract.



**Fig. 3.** Antimicrobial activities of PDEE and T-PDEE against *S. aureus* and *S. epidermidis*. 1: *S. aureus*+*Pinus densiflora* ethanol extract, 2: *S. aureus*+Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract, 3: *S. epidermidis*+*Pinus densiflora* ethanol extract, 4: *S. epidermidis*+Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract. A: DW, B: 50 mg/mL, C: 100 mg/mL, D: 200 mg/mL.

*aureus*에 대해 PDEE는 농도 의존적으로 clear zone이 증가한 반면 T-PDEE에서는 모든 농도에서 약 10 mm 이상의 clear zone이 나타났다. *S. epidermidis*에 대한 PDEE와 T-PDEE의 항균 활성은 시료의 농도가 증가할수록 clear zone의 크기도 증가함을 알 수 있었고 T-PDEE에서 더 높은 항균 활성이 나타났다. T-PDEE가 PDEE 보다 항균 활성이 더 높게 나타나 항산화능과 마찬가지로 trypsin의 처리가 항균 활성에 영향을 주는 것으로 보여지며, T-PDEE의 항균력은 전반적으로 *S. aureus*보다 *S. epidermidis*에서 크게 나타났다.

#### IV. 고찰

본 연구는 적송잎 에탄올 추출물(*Pinus densiflora* ethanol extract, PDEE)과 단백질 분해효소인 trypsin을 처리한 적송잎 에탄올 추출물(Trypsin-treated *Pinus*

*densiflora* ethanol extract, T-PDEE)의 항산화 및 항균활성을 비교하여 활용가능성을 확인하고자 하였다.

PDEE와 T-PDEE의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 PDEE에서 73.3 mg/g, T-PDEE에서 100.0 mg/g으로 나타나 trypsin을 처리한 것이 더 높게 나타났다. 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과에서도 PDEE에서 30.0 mg/g, T-PDEE에서 67.6 mg/g으로 나타나 T-PDEE에서 더 높은 함량을 확인할 수 있었다. 폴리페놀 및 플라보노이드는 항산화작용을 통해 외부 물질에 의해 생성된 활성산소종의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>20)</sup> 모정희(2013)의 연구<sup>21)</sup>에서 더덕과 발효더덕 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정하였을 때 총 폴리페놀 함량은 26.4, 32.7 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 0.6, 1.4 mg/g으로 발효공정을 통해 더덕추출물의 항산화능이 강화되었으며, 이 결과를 미루어볼 때 발효공정은 물질이 가지는 생리활성능을 상승 할 수 있는

**Table 4.** Size of clear zone against *S. aureus* and *S. epidermidis* by extracts

Bacterial strain	Extracts	Concentrations (mg/mL)	Mean±SD
<i>S. aureus</i>	PDEE <sup>1)</sup>	0	-
		50	9.50±0.35 <sup>a</sup>
		100	10.47±0.38 <sup>bc</sup>
	T-PDEE <sup>2)</sup>	200	11.13±0.23 <sup>de</sup>
		0	-
		50	10.80±0.10 <sup>cd</sup>
<i>S. epidermidis</i>	PDEE <sup>1)</sup>	100	11.03±0.15 <sup>de</sup>
		200	11.77±0.31 <sup>f</sup>
		0	-
	T-PDEE <sup>2)</sup>	50	10.20±0.46 <sup>b</sup>
		100	11.00±0.10 <sup>de</sup>
		200	13.16±0.15 <sup>g</sup>
T-PDEE <sup>2)</sup>	0	-	
	50	10.43±0.42 <sup>bc</sup>	
	100	11.43±0.25 <sup>ef</sup>	
		200	13.66±0.30 <sup>h</sup>

Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

<sup>1)</sup>PDEE: *Pinus densiflora* ethanol extract.

<sup>2)</sup>T-PDEE: Trypsin-treated *Pinus densiflora* ethanol extract.

것으로 보여진다. 본 연구에서는 단백질 분해효소인 trypsin 처리를 통해 물질이 가지는 생리활성능의 상승 정도를 확인하였으며, trypsin 처치 시 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량이 증가되었음을 확인하였다. 전자공여능을 평가하는 DPPH assay와 radical 소거능을 평가하는 ABTS<sup>+</sup> assay를 통해 실험물질의 항산화능을 평가하였다. DPPH assay와 ABTS<sup>+</sup> assay 결과 모두 250 µg/mL 이상의 농도에서 trypsin의 처리 여부와 상관없이 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사한 활성을 나타냈으며, 이것은 적송 자체의 높은 항산화능을 확인할 수 있는 결과라고 할 수 있다. 또한 PDEE와 T-PDEE 모두 250 mg/mL 이하의 농도에서 농도 의존적으로 항산화능이 증가함을 확인하였으며, trypsin으로 인해 PDEE의 항산화 활성이 증가됨을 확인할 수 있었다. 강승협(2015)의 연구<sup>22)</sup>에서 같이 솔잎은 항산화능이 높은 물질로 확인되었으며, 솔잎의 일종인 적송잎 또한 본 연구를 통해 솔잎과 같이 높은 항산화능을 확인할 수 있었다. 이러한 적송잎에 trypsin을 처리함으로써 항산화

활성이 더욱 증가하였으며, 이러한 결과는 효소처리가 적송잎의 다양한 효능을 극대화할 수 있는 가능성을 제시하는 것으로 볼 수 있다.

최근 합성 보존제의 독성으로 인해 다양한 부작용이 발생하면서 사회적 관심이 높아지고, 소비자들은 합성 보존제가 아닌 천연 보존제를 선호하는 경향이 늘고 있다.<sup>23)</sup> 하지만 현재 알려져 있는 보존제로 응용이 가능한 천연원료는 좁은 항균 스펙트럼과 사용범위의 한계로 인해 사용에 제한이 있다.<sup>24)</sup> 그러므로 천연보존제로서 적송잎 추출물의 활용 가능성을 확인하고 trypsin처리에 따른 활성도 증대를 비교하기 위해 paper disk diffusion assay를 통해 2가지 피부상재균에 대한 항균 활성을 비교하였다. 그 결과 모든 균에서 항균 활성이 나타났으며, 모든 피부상재균에서 T-PDEE가 PDEE 보다 항균 활성이 더 높게 나타나 항산화능과 마찬가지로 단백질 분해효소인 trypsin의 처리가 항균 활성에 도움을 주는 것으로 보인다. 특히 T-PDEE는 *S. aureus*보다 *S. epidermidis*에서 항균 활성이 더 좋게 나타나, 이 물질은 피부를 감염시키는 병원균에 더 좋은 효과를 보이는 것으로 생각되어진다.

최근 식품 및 화장품 산업에서 효소처리와 같은 공정을 추가하여 원료의 효능을 극대화하는 방법이 트렌드화 되고 있는 시점에서, 활용 가능성을 높이기 위한 방법으로 효소의 처리는 그 활용가치가 높은 것으로 보인다.

## V. 결 론

본 연구는 단백질 분해효소인 trypsin이 적송잎 에탄올 추출물(*Pinus densiflora* ethanol extract, PDEE)의 항산화 및 항균활성 증가에 미치는 영향을 확인하여 다양한 산업분야에서 응용가능성을 제시하고자 하였다.

시험결과 trypsin을 처리한 적송잎 에탄올 추출물이 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량이 처리 전 적송잎 에탄올 추출물보다 높은 수치를 보였으며, DPPH 전자공여능, ABTS<sup>+</sup> radical 소거능 또한 처리 전 적송잎 에탄올 추출물보다 높은 수치를 보여 trypsin의 처리는 항산화 활성에 영향을 주는 것으로 보인다. Paper disc diffusion assay 결과 2종의 피부상재균에서 항균 활성을 확인하였으며, T-

PDEE가 PDEE보다 활성이 높은 것으로 보아 trypsin은 PDEE의 항균력을 증가시키는 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 단백질 분해효소인 trypsin은 적송잎 에탄올 추출물에 항산화능 및 항균 효과에 영향을 미치며, trypsin을 통해 그 효능이 증진시킬 수 있을것으로 사료되어 진다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원에서 수행하는 천연물 유래 성분을 이용한 할랄 인증용 기능성 소재 및 수출용 화장품 개발(과제 번호: 315052-3)의 지원에 의해 수행되었습니다. 이에 깊은 감사를 드립니다.

### References

1. Yang SJ, Woo KS, Yoo JS, Kang TS, Noh YH, Lee JS, et al. Change of Korean Ginseng Components with High Temperature and Pressure Treatment. *Korean J Food Sci Technol.* 2006; 98(4):521-525.
2. Kwon SC, Choi GH, Hwang JH, Lee KH. Physicochemical Property and Antioxidative Activity of Hot-Water Extracts from Enzyme Hydrolysate of *Astragalus membranaceus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010; 39(3): 406-413.
3. Park MK. Effect of Enzymatic Hydrolysis by Proteases on Antioxidant Activity of *Chungkukjang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2011; 40(2): 327-333.
4. Jang YS, Jeong JM. Antioxidative Effect and Digestive Enzyme Inhibition of Grape Seed Extract (GSE). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010; 39(6): 783-788.
5. Kim SY, Lee MH, Jo NR, Park SN. Antibacterial Activity and Skin Moisturizing Effect of *Cedrela sinensis* A. Juss Shoots Extracts. *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2010; 36(4): 315-321.
6. Sung HC, Jung HD, Park KD, Lee WJ, Lee SJ, Kim DW. A Quantitative Culture Study of *Staphylococcus aureus* in Adolescent and Adult Patients with Atopic Dermatitis using the Contact-plate Sampling Technique. *Korean J Dermatol.* 2007; 47(7): 673-679.
7. Yang SA, Kim AY, Pyo BS, Kim SM. Antibacterial and Antibiotic Activity Enhancing Effect of Extract and Fractions from the Root of *Rumex japonicus* Houtt. *Korean J Medicinal Crop Sci.*

- 2017; 25(6): 375-380.
8. Kang SR, Kim YK, Kim SG, Lee SH, Kim MH. The Effect of Pine (*pinus densiflora*) Needle Extracts on Blood Flow and Serum Lipid Improvement. *Journal of Life Science.* 2009; 19(4): 508-513.
9. Kim YS, Shin DH. Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. *Food Microbiol.* 2005; 22: 37-45.
10. Hsu TY, Sheu SC, Liaw ET, Wang TC, Lin CC. Anti-oxidant activity and effect of *Pinus morrissonicola* Hay. on the survival of leukemia cell line U937. *Phytomedicine.* 2005; 12: 663-669.
11. Sanders KM. A Case for Interstitial Cells of Cajal as Pacemakers and Mediators of Neurotransmission in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology.* 1996; 111: 492-515.
12. Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol.* 1994; 480: 91-97.
13. Tokutomi N, Maeda H, Tokutomi Y, Sato D, Sugita M, Nishikawa S, et al. Rhythmic Cl<sup>-</sup>current and physiological roles of the intestinal *c-kit*-positive cells. *Pflugers Arch.* 1995; 431: 169-177.
14. Thomson L, Robinson TL, Lee JC, Faraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, et al. Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med.* 1998; 4: 848-851.
15. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, et al. Protective Effects of Grape Seed Proanthocyanidins and Selected Antioxidants against TPA-Induced Hepatic and Brain Lipid Peroxidation and DNA Fragmentation, and Peritoneal Macrophage Activation in Mice. *Gen Pharmacol.* 1998; 30: 771-776.
16. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem.* 1912; 12: 239-243.
17. Davies R, Massey RC, McWeeny DJ. The catalysis of the *N*-nitrosation of secondary amines by nitrosophenols. *Food Chem.* 1980; 6: 115-122.
18. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *nature.* 1958; 181: 1199-1200.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1231-1237.
20. Lee YJ, Kim TY, Chung HW. Protective Effects of Ginkgo Biloba Leaf Extract (GBE) against 1,2,4-

- benzenetriol Induced Toxicity *in Vitro*. *J Environ Health Sci*. 2001; 27: 124-130.
21. Mo JH, Kim MA, Kang EJ. A Comparative Study of the Physiological Activities of Skin between *Codonopsis lanceolata* and Fermented *C. lanceolata* Extracts as Cosmetic Ingredient. *Journal of the Korea Soc Beauty and Art*. 2013; 14: 49-60.
22. Kang SH. Identification of Anti-oxidative, Skin Whitening and Anti- wrinkle Constituents from the Leaves of *Pinus densiflora* and *Sargassum Muticum*, [dissertation]. [Jeju]: Jeju University; 2015
23. Kim BY, Lee JH, Kim SY, Lee EJ, Choi CR, Kho YL. Determination of Preservatives in Pharmaceuticals and Personal Care Products. *J Environ Health Sci*. 2016; 42: 53-60.
24. Hwang SH. Preservation of *Scutellariae Radix* Extract for Cosmetics, [dissertation]. [Seoul]: Kyung Hee University; 2009.