

에탄올 농도에 따른 돌외 잎 차 추출물의 생리활성

김경철 · 김주성

Physiological activity of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea by different ethanol concentrations

Kyeongcheol Kim · Ju-Sung Kim

Received: 30 October 2018 / Revised: 29 November 2018 / Accepted: 30 November 2018
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract The objective of this study was to compare the effects of different concentration of ethanol extraction on the total phenol and flavonoid contents and physiological activities. The total phenol content of the extracts ranged from 35.54 to 71.52 mg GAE/g. An increase in the ethanol concentration of the solvent led to an increase in the phenol content, with the highest content being found in the 80 and 99.5% ethanol extract. The same trend was observed for flavonoid content. DPPH, nitric oxide, superoxide, hydroxyl radical scavenging activity and TEAC, FRAP and ORAC were measured by antioxidant assay. Radical scavenging activity of aqueous ethanol extracts was better than that of water and 99.5% ethanol extracts. TEAC and FRAP were highly dependent on ethanol concentration and ORAC showed high activity in 40 ~ 80% ethanol extract. Antioxidant activity of Dolwoe leaves tea showed different results among the assay systems. In most experiments, the activities of water and 99.5% ethanol extracts was relatively low. α -Glucosidase inhibitory activity and microorganism inhibitory activity were highest in the 80% and 99.5% ethanol extracts. Therefore, it was considered that extraction with 80% ethanol was appropriate when considering the antioxidative and physiological activities of Dolwoe leaves tea. Based on these results, it can be used as a basic data for the development of food of Dolwoe leaves tea.

Keywords Antioxidant, Bacterial inhibition, Ethanol concentration, Flavonoid, α -Glucosidase inhibition, Tea extract

서 언

인간은 생존에 있어 호흡과정이 필수적이며 이러한 과정에서 체내에 산소가 유입된다. 유입된 산소는 대사과정이나 광화학적 반응, 화학 물질 등 여러 요인에 의하여 반응성이 높은 산소화합물이 생성된다(Beckman and Ames 1998). 체내에 생성된 활성산소는 일정농도로 존재할 때 침입한 박테리아, 세균 등을 제거하기 위한 면역 반응에 관여하지만 체내 활성산소와 항산화제 사이에 불균형이 나타나 산화 스트레스 상태가 되면 심혈관계 질환, 암, 노화, 당뇨병 등의 질병에 노출되게 된다(Ratnam et al. 2006). 따라서 생체 내의 활성산소를 조절하기 위한 보조적 수단으로 항산화제와 관련된 연구가 요구되고 있다.

소득이 증가하고 생활수준이 향상됨에 따라 식품의 영양 기능과 감각기능 보다 생체방어, 질병예방 및 노화억제 등의 생체조절기능에 관심이 증가하게 되었다. 식물성 식품에는 활성산소종 제거 효과를 나타내는 항산화 물질이 존재하게 되는데 주로 ascorbic acid, tocopherol과 같은 비타민 류, 플라보노이드, 폴리페놀 물질이 대표적이다. 식물의 대표적인 2차 대사산물 중 하나인 페놀성 화합물은 현재까지 약 8,000종 이상 밝혀졌으며 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고하였다(Huang et al. 2009). 특히 기호식품인 차는 우수한 항산화물질을 함유하고 있어 관심의 대상이 되는 식품군이다. 차를 제조할 때 주로 열을 가하는 덥음 처리 공정을 시행하게 되는데 식물체에 적절한 열이 가해지면 유효성분 추출 증대 및 맛이나 향을 더 이끌어내는 역할을 한다고 보고되었다(Kim et al. 1996; Ryu et al. 1997). 이러한 덥음

K. C. Kim · J.-S. Kim (✉)
제주대학교 식물자원환경전공
(Major in Plant Resource and Environment, SARI, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)
e-mail: aha2011@jejunu.ac.kr

처리 공정을 통하여 2차 대사산물을 가진 식물을 식품으로 이용하기 위한 차 개발이 진행되고 있다(Xu et al. 2018). 하지만 제조된 차를 음용할 경우 일반적으로 열수 추출된 성분 위주로 흡수되기 때문에 효율적인 섭취가 제한된다.

돌의는 박과에 속하는 덩굴성 식물로 우리나라에서는 덩굴차, 덩굴잎차 등의 여러 이름으로 부른다. 돌의의 사포닌은 80종 이상이 존재하고 있으며 주요 gypenoside는 생리활성 측면에서 항산화와 더불어 항비만(Lu et al. 2018), 항당뇨(Megalli et al. 2006), 항암(Liu et al. 2014) 등의 다양한 효과가 보고되고 있다. 돌의 잎은 주로 덩을 가공 처리를 거쳐 차의 형태로 이용된다. 또한 건강기능식품 기능성 원료로 인정되어 돌의 추출물은 긴장완화, 체지방 감소와 관련된 식품으로 사용된다. 따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 가진 국내산 돌의 잎 차의 기능성 소재로써 이용가능성을 높이기 위해 에탄올 농도를 달리하여 추출물을 제조한 뒤 각 추출물에 대한 항산화 활성 및 생리활성을 비교 분석하였다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 돌의 잎 차의 기호음료 및 가공식품의 개발에 있어 제조 조건의 용매 설정을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 돌의 잎 차는 덩을 공정(1회 덩을: 160°C에서 7분, 30분 실온 숙성, 2회 덩을: 180°C에서 12분, 30분 실온 숙성, 3회 덩을: 180°C에서 7분, 30분 실온 숙성)을 거쳐 제조하였다. 추출에 앞서 0.5 mm 크기로 분쇄하였고 시료 5 g에 각 100 mL씩 증류수와 20%, 40%, 60%, 80%, 99.5% 농도 에탄올을 가한 뒤 80°C에서 3시간 동안 추출하였다. 추출된 여과액은 감압회전농축기(Hel-VAP Precision, Heidolph, Germany)로 용매를 제거한 뒤 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

돌의 잎 차 에탄올 농도별 추출물의 총 페놀 함량은 Ko et al. (2017)의 방법으로 측정하였다. 추출물 20 µL에 증류수 700 µL와 50% Folin-Ciocalteu 시약 100 µL를 혼합하였다. 2시간 반응 후 20% sodium carbonate 용액을 100 µL씩 가하여 1시간 동안 발색하고 i-Mark microplate reader (168-1135, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 750 nm의 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량의 계산은 gallic acid를 표준품으로 검량선을 작성하였고 추출물 g당 GAE (gallic acid equivalent)로 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 Ko et al. (2017)의 방법으로 측정하였다. 추출물에 100 µL에 에탄올 300 µL, 10%(w/v) aluminum

nitrate 20 µL와 1 M potassium acetate 20 µL를 혼합한 다음 증류수 560 µL를 가하여 1시간 반응하였다. 반응액은 microplate reader를 사용하여 415 nm 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량의 계산은 quercetin을 표준품으로 작성한 검량선을 작성하였고 추출물 g당 QE (quercetin equivalent)로 나타내었다.

Radical 소거 활성 측정

DPPH radical 소거능은 Blois (1958)의 방법을 응용하여 측정하였다. 추출물과 0.15 mM DPPH를 1:4 비율로 총 200 µL로 혼합하고 암실에서 30분간 반응시켰다. 반응액은 microplate reader로 490 nm의 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide radical 소거능은 10 mM sodium nitroprusside dihydrate (SNP)와 추출물을 1시간 30분 반응한 뒤 Griess reagent를 100 µL 가하여 10분 뒤 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide radical 소거능은 추출물 50 µL에 150 µM nitroblue tetrazolium, 50 µL, 60 µM phenazine methosulfate 50 µL, 468 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide 50 µL를 가하고 5분 뒤 560 nm의 흡광도를 측정하였다.

Hydroxyl radical 소거능을 측정하기 위하여 0.1 unit/mL esterase 10 mL에 1 mM dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) 20 µL를 가하고 37°C에서 30분 간 배양하여 esterase treated DCFH-DA를 제조하였다. 추출물 50 µL와 0.2 mM FeSO₄ 50 µL, 2 µM esterase treated DCFH-DA 50 µL를 가한 뒤 1 mM H₂O₂ 50 µL를 처리하였다. 반응액은 30분 뒤 excitation 460 nm, emission 530 nm에서 형광도를 측정하여 계산하였다.

항산화 지수 측정

Zulueta et al. (2009)의 방법을 변형하여 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)를 측정하였다. 우선적으로 7 mM 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 16시간 반응하여 ABTS 용액을 제조하고 734 nm의 흡광도 값이 0.70±0.02 범위가 되도록 만들어 실험에 이용하였다. 추출물 50 µL와 ABTS 용액 1 mL를 5분 간 반응하여 UV-spectrometer (UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용해 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trolox를 농도별로 처리하여 측정된 흡광도는 추출물의 TEAC 값 계산에 사용하였고 추출물 g당 TE (trolox equivalent)로 나타냈다.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 측정을 통해 추출물의 환원력을 확인하였다(Benzie and Strain 1996). 10 mM 2,4,6-tripyridyls-triazine (TPTZ)과 20 mM FeCl₃를 1:1 비율로 혼합한 뒤 0.3 M sodium acetate buffer (pH 3.6)를 가하고 37°C에서 10분간 반응하여 FRAP working solution을 제조하였다. 제조된 FRAP working solution 150 µL와 추출물 5 µL을 37°C

조건에서 30분간 발색하여 microplate reader를 이용해 595 nm의 흡광도를 측정하였다. FeSO₄를 농도별로 처리하여 측정된 추출물의 FRAP 값 계산에 사용하였고 추출물 g당 FE (FeSO₄ equivalent)로 나타냈다.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)는 추출물 50 µL에 78 nM fluorescein 용액을 150 µL 가하여 37°C에서 10분 처리하고, 221 mM 2,2'-azobis(2-amino-propane) dihydrochloride 50 µL를 가하여 감소되는 형광도를 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 1시간 동안 1분 간격으로 측정하였다(Zulueta et al. 2009). 측정된 형광도를 이용하여 Area under the curve (AUC)를 산출하였고, trolox의 AUC에 대비하여 추출물의 AUC를 계산한 뒤 g당 TE (trolox equivalent)로 나타냈다.

α-Glucosidase 저해활성

α-Glucosidase 저해활성을 측정하기 위하여 Kim and Kim (2016)의 방법을 기반으로 측정하였다. 추출물 20 µL에 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8) 120 µL와 α-glucosidase (0.3 U/mL) 50 µL를 혼합하고 37°C에서 배양하였다. 10분간 배양한 시료는 2 mM p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (pNPG) 10 µL를 가하여 37°C에서 반응하고 100 mM sodium carbonate를 100 µL로 30분 뒤 반응 정지시켜 microplate reader로 415 nm 흡광도를 측정하였다. 각 에탄올 농도별 추출물의 활성을 비교 분석하였고 혈당강하제로 사용되는 acarbose를 대조군으로 사용하였다.

미생물 저해활성

미생물 저해활성 측정에 이용된 균주는 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 분양받아 사용하였다. 실험 균주는 그람양성균 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Micrococcus luteus* (KCTC 1056)와 그람음성균 *Pseudomonas aeruginosa* (KCTC 1750), *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (KCTC 2208)을 대상으로 생장 저해능을 확인하였다. 우선적으로 각 균주를

3회 계대배양하고 배지로 희석하여 배양액을 제조하였다. 저해활성을 측정하기 위하여 배양액과 추출물을 혼합하여 추출물의 최종 농도를 1 mg/mL가 되도록 제조하였다. 혼합액은 각 균주의 적정 온도에서 배양하며 4시간 간격으로 24 시간 동안 microplate reader 595 nm의 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 추출물을 처리하지 않은 균주의 생장 곡선을 비교하였고 양성대조군으로 tetracycline과 streptomycin을 사용하였다.

통계분석

본 연구의 실험은 3회 반복하여 측정하였고 각 데이터는 평균±표준편차로 나타냈다. 각 추출물의 유의적인 차이는 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, ver. 18.0)로 일원분산분석과 Tukey의 다중범위검정(Tukey Multiple Range Test, TMRT)방법으로 유의적인 차이를 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

총 페놀 및 플라보노이드 함량

식물 추출물에 있는 페놀성 물질은 항산화활성과 밀접하게 관련되어 있다(Rice-Evans et al. 1997). 개별 성분에 따른 활성의 차이는 나타나지만 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드의 함량이 높을수록 생리활성 측면에서 유리하게 작용할 수 있다. 돌외 차 추출물의 총 페놀 함량은 평균 35.54~71.52 mg GAE/g으로 추출에 사용한 에탄올 농도 의존적으로 증가하는 경향이 확인되었다(Table 1). 그러나 80% 에탄올 추출물과 99.5% 에탄올 추출물의 총 페놀 함량에서 통계적 유의성은 확인되지 않았다. 총 플라보노이드 함량은 페놀 함량과 비슷한 경향을 보였다(Table 1). 5.37~28.91 mg QE/g의 범위로 나타났으며 추출용매로 사용한 에탄올 농도에 영향을 받

Table 1 Total phenol and flavonoid contents of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea with different ethanol concentrations

Samples	Total phenol (mg GAE/g) ^a	Total flavonoid (mg QE/g) ^b
Distilled water extract	35.54±0.75 e	5.37±0.21 f
20% ethanolic extract	47.83±0.93 d	7.65±0.17 e
40% ethanolic extract	59.50±1.09 c	14.42±0.07 d
60% ethanolic extract	64.86±1.49 b	20.00±0.04 c
80% ethanolic extract	68.80±1.66 a	23.86±0.14 b
99.5% ethanolic extract	71.52±1.01 a	28.91±0.05 a

Means with different letters (a-f) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (SPSS, Tukey)

^aTotal phenolic content analyzed as gallic acid equivalent (GAE) mg/g of extract; values are the average of triplicates

^bTotal flavonoid content analyzed as quercetin equivalent (QE) mg/g of extract; values are the average of triplicates

아 99.5% 에탄올로 추출하였을 때 28.91 mg QE/g으로 가장 높은 함량이 확인되었다. Kim and Kim (2018)의 연구에서 가공되지 않은 건조 돌의 잎의 경우 추출 용매로 사용한 에탄올 농도에 따라 총 페놀 함량이 농도 의존적으로 증가하여 본 실험의 결과와 추출 경향이 유사하였다. 반면 총 플라보노이드 함량은 99.5% 에탄올 보다는 60~80% 에탄올로 추출하였을 때 더 높다고 보고하였다. 이러한 결과는 식물체에 대한 열처리로 결합형 폴리페놀 화합물이 유리형 폴리페놀로 전환되어 추출물의 페놀성 화합물 함량이 증가되었다는 보고처럼 건조 돌의 잎과 돌의 잎을 덩음 처리하여 가공하는 과정에서 플라보노이드 성분의 변화가 나타난 것으로 사료된다(Hwang et al., 2011). 일반적으로 식물 추출물 제조시 물과 에탄올이 혼합된 에탄올 수용액 형태가 침투용이성이 높아 페놀성 화합물 추출에 유리하다고 보고되고 있다(Won et al. 2015). 하지만 덩음 공정을 처리한 돌의 잎 차는 열처리로 추출 효율이 증가하여 에탄올과 같은 유기용매를 사용하였을 경우 높은 페놀 및 플라보노이드가 관찰된 것으로 판단된다. 또한 Kim and Kim (2018)의 연구에서 건조 돌의 잎 에탄올 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 66.34mg GAE/g, 6.98mg QE/g인 반면 덩음 처리를 통하여 추출되는 페놀성 물질의 양은 그보다 증가된 것을 확인하였다.

Radical 소거 활성

항산화 활성 측정방법에 따라서 시료의 항산화 활성이 다르게 나타나기 때문에 다양한 검색방법을 이용해야 한다(Moon et al. 2003). 돌의 차 추출물의 다양한 radical 소거능의 실험결과 radical 종류에 따라 활성이 각기 다른 경향이 관찰되었다(Table 2). DPPH radical 소거능은 polyhydroxy aromatic compounds, aminophenol 등의 aromatic amine 등에 환원되어 보라색에서 노란색으로 탈색이 나타나는 원리로 수소공여능 측정과 자유 라디칼 측정에 사용되는 실험이다(Blois 1958). 결과로는 추출용매와 관련된 경향은 확인되지 않았으나 80% 에탄올 추출물에서 190.56 µg/mL로 가장 높은 활성이

확인되었다. 그리고 물 추출물에서 294.07 µg/mL로 가장 낮은 활성이 나타났다. Nitric oxide는 superoxide와 반응하게 되면 peroxynitrite를 형성하게 되는데 이 화합물은 독성을 가지며 강한 산화제의 특징이 있어 단백질, DNA 등의 손상과 노화, 암, 염증 등의 중요한 요인으로 작용한다(Althaus et al. 1994). 이에 따라 돌의 차 추출물의 소거능을 측정하였고, 실험결과 superoxide radical 소거능은 20, 40% 에탄올 추출물이 각각 210.47, 204.38 µg/mL로 유의적으로 높은 활성이 나타났다. Nitric oxide radical 소거능에서는 40, 60% 에탄올 추출물에서 255.42, 253.07 µg/mL로 유의적으로 활성이 높았다. 자유 라디칼 중에서 가장 강한 독성을 가진 것으로 알려진 hydroxyl radical은 반응속도와 반응성이 매우 큰 특징을 가지고 있다(Halliwell and Aruoma 1991). 이러한 특징은 지질의 산화와 DNA 손상을 야기하여 다양한 질환에 원인이 된다. 돌의 차 추출물의 hydroxyl radical은 소거능은 물 추출물과 20% 에탄올 추출물에서 유의적인 차이는 보이지 않았으나 그 이후 80% 에탄올 추출물까지 활성이 증가하다가 99.5% 에탄올 추출물에서 약간 감소하는 결과를 보였다. Hydroxyl radical 소거능은 추출물의 총 페놀 함량 및 플라보노이드 함량이 높은 80, 99.5% 에탄올이 활성이 우수하였다. 이러한 결과는 유기 용매로 추출된 페놀성 화합물이 hydroxyl radical 소거능에 영향을 미친 것으로 생각된다. 실험결과를 종합하여 볼 때 radical 소거능 실험은 각기 다른 경향이 나타났다. 이는 radical에 따라 효과적으로 작용하는 성분이 다를 수 있으며 용매에 따라 추출된 성분이 차이를 보인 것으로 사료된다.

항산화 지수

돌의 차 추출물의 항산화 지수를 계산한 결과는 Table 3과 같다. TEAC 값은 ABTS radical 소거능을 trolox에 대한 함량으로 계산하여 나타낸 지수로 다양한 식물 추출물의 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 이용되고 있다. TEAC는 Rice-Evans et al. (1997)의 연구에서 폴리페놀 구조와 활성 관계를 비교 분석하기 위하여 고안된 실험으로 ABTS radical이 물과

Table 2 The radical scavenging activity of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea with different ethanol concentrations

Samples	RC ₅₀ (µg/mL) ^a			
	DPPH	Nitric oxide	Superoxide	Hydroxyl
Distilled water extract	294.07±4.32 e	335.47±0.76 c	302.15±7.32 b	652.70±65.36 d
20% ethanolic extract	227.04±3.01 c	313.63±3.95 b	210.47±5.54 a	644.08±25.07 d
40% ethanolic extract	202.85±6.18 b	255.42±1.70 a	204.38±13.81 a	489.56±13.22 bc
60% ethanolic extract	220.88±0.46 c	253.07±3.06 a	366.61±12.57 c	502.93±9.40 c
80% ethanolic extract	190.56±0.87 a	398.44±3.16 d	>1000 d	364.14±3.49 a
99.5% ethanolic extract	265.20±0.95 d	>1000 e	>1000 d	378.66±4.73 ab

Means with different letters (a-e) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (SPSS, Tukey)

^aRC₅₀ (µg/mL) Amount required for a 50% reduction of radicals

Table 3 Antioxidant capacity of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea with different ethanol concentrations

Samples	TEAC (mM TE/g) ^a	FRAP (mM FE/g) ^b	ORAC (mM TE/g) ^c
distilled water extract	85.79±0.87 d	131.78±4.89 e	588.36±89.16 b
20% ethanolic extract	126.41±2.49 c	183.57±4.09 d	870.82± 1.22 ab
40% ethanolic extract	146.85±7.87 ab	288.23±3.36 b	1137.80±32.42 a
60% ethanolic extract	154.85±2.36 a	262.17±2.52 c	1137.19±28.70 a
80% ethanolic extract	141.11±1.67 b	318.62±2.68 a	1019.36±40.18 a
99.5% ethanolic extract	153.90±1.72 a	320.78±1.44 a	658.66±168.83 b

Means with different letters (a-e) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (SPSS, Tukey)

^aTEAC analyzed as trolox equivalent (TE) mM/g of extract; values are the average of triplicates

^bFRAP analyzed as ferrous sulfate equivalent (FE) mM/g of extract; values are the average of triplicates

^cORAC analyzed as trolox equivalent (TE) mM/g of extract; values are the average of triplicates

유기용매에 용해가 가능하여 극성과 무관하게 항산화능 측정 가능성이 알려져 있다. 돌외 차 추출물의 TEAC 값은 물 추출물에 비해 추출 용매에 에탄올이 포함되어 있을 때 증가하는 경향을 보였다. 또한 용매의 에탄올 함량이 40% 이상일 때 활성이 증가한 것으로 확인되었다. 특히 TEAC 값이 유의적으로 높은 99.5% 에탄올(153.90 ± 1.72 mM TE/g)은 물 추출물(85.79 ± 0.87 mM TE/g)보다 1.8배 더 활성이 높았다. FRAP법은 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 항산화능을 측정하기 위해 항산화 물질과 반응하여 철 이온이 환원되는 원리로 고안된 실험방법이다 (Benzie and Strain 1996). FRAP 값은 80%, 99.5% 에탄올 추출물이 유의적으로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 TEAC와 비슷한 경향이었고 물 추출물(131.78 ± 4.89 mM FE/g)과 99.5% 에탄올 추출물(320.78 ± 1.44 mM FE/g)의 활성은 2.4배 이상 차이를 보였다. ORAC법은 추출물의 과산화물에 대한 전반적인 항산화능을 측정할 수 있는 실험방법으로 돌외 차 추출물의 ORAC 값의 범위는 588.36 ~ 1137.80 mM TE/g로 40 ~ 80% 에탄올 수용액 용매로 추출하였을 때 더 높은 값을 보였다. 물 추출물(588.36 ± 89.16 mM TE/g)보다 20 ~ 80% 에탄올 수용액 추출물(870.82 ~ 1137.80 mM TE/g)에서 ORAC 활성이 증가하였다가 99.5% 에탄올 추출물(658.66 ± 168.83 mM TE/g)에서 활성이 감소하는 결과를 보였다. 돌외 차 추출물의 각 항산화 지수 결과는 TEAC, FRAP과 ORAC 값의 경향이 상이하게 나타났다. Kim et al. (2014)의 연구에서 산국대 추출물의 TEAC, FRAP, ORAC 실험을 BHT와 비교하여 측정하였다. BHT의 활성은 산국대 추출물보다 TEAC와 FRAP의 활성은 더 높게 나타났으나 ORAC는 낮게 나타났다고 보고하였다. 이러한 결과는 추출물에서 작용하는 물질에 따라 항산화 활성에 차이가 나타날 수 있다고 추측할 수 있다. 에탄올은 소수성 및 친수성을 모두 가진 효과적인 용매로 에탄올 수용액의 경우 물과 혼합 정도에 따라 용매 성질인 극성과 밀도가 변화하게 되고, 삼투압에도 영향을 준다. 따라서 용매 특성에 따라 용출되는 주 성분에도 변화가 나타나게 되고 항산화

지수에도 유의인자로 작용한 것으로 사료된다.

α-Glucosidase 저해활성

α-Glucosidase는 글루코시드를 가수분해하여 단당과 아클리콘을 생성하는 반응에 촉매 효소를 일컫는다. 이러한 효소는 인간이 식품을 섭취하였을 때 amylase와 함께 당 분해 효소로 관여하여 혈당을 높게 된다. 그러나 체내 혈당 대사를 조절하기 어려운 당뇨 환자의 경우 고혈당으로 인한 위험성이 있어 acarbose와 같은 혈당강화제의 복용이 필요하다. 하지만 acarbose의 경우 장기간 복용에 따른 일부 부작용 사례가 보고되어 비교적 안전한 천연물에서 새로운 소재 개발 연구가 진행되고 있다. 특히 Megalli et al. (2006) 연구에서 당뇨병 모델 쥐에게 돌외 추출물 gepenoside를 제형화시켜 투여한 경우 고혈당을 낮추는데 유의한 효과가 나타났다고 보고하였다. 이에 따라서 추출 용매에 따른 α-glucosidase 저해활성의 차이를 비교 분석하여 적정 농도의 에탄올 용매를 선정하기 위해 수행하였다. 돌외 잎 차 추출물의 α-glucosidase 저해활성은 Figure 1과 같다. 모든 추출물에서 양성대조군으로 사용한 acarbose보다는 유의적으로 낮은 활성을 가지고 있었다. 그러나 정제되지 않은 추출물임을 감안한다면 단일 물질화 되었을 때 더 높은 저해활성을 가질 수 있다고 사료된다. 각 에탄올 추출물에 따른 활성을 비교하였을 때 1000 µg/mL 농도에서 총 페놀 및 플라보노이드 함량이 높았던 80%, 99.5% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성을 가진 것으로 확인되었다. 250, 500 µg/mL의 농도에서는 99.5% 에탄올 추출물의 α-glucosidase 저해활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 항당뇨 활성에 대하여 마전자와 토후박 추출물에 대한 α-glucosidase 저해활성이 연구되었는데, 이러한 추출물들의 α-glucosidase 저해활성은 총 페놀 함량이 높을수록 더 높은 활성을 나타냈고 페놀성 물질에 의하여 효소가 저해되는 것으로 보고하였다(Lee et al., 2010; Xu et al., 2010). 이에 따라 본 실험의 총 페놀 함량이 높았던 80%, 99.5% 에탄올 추출물이

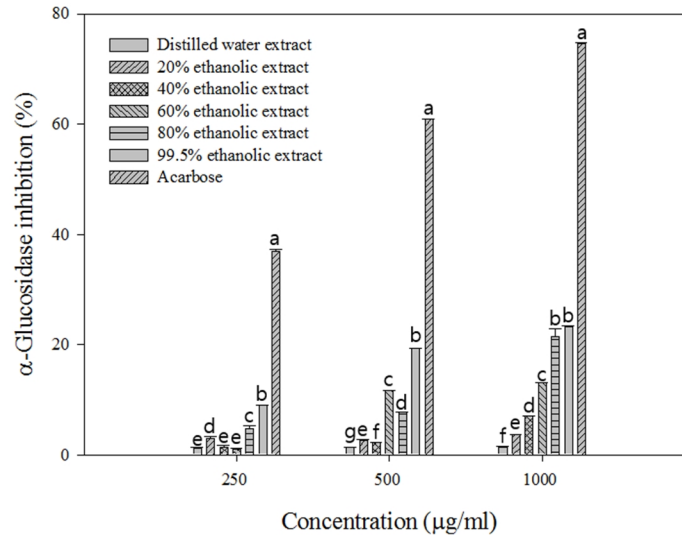


Fig. 1 α-Glucosidase inhibitory effects of extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea with different ethanol concentrations

Means with different letters (a-g) in the same column are significantly different at $p < 0.05$ (SPSS, Tukey)

높은 활성을 보인 것은 추출물에 포함되어 있던 페놀성 물질에 기인하여 나타난 결과로 생각된다.

미생물 저해활성

에탄올 농도별 돌외 차 추출물의 그람 양성균 2종(*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*)과 그람 음성균 2종(*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*)에 대한 생육 저해 활성은 Figure 2와 같다. 그람 양성균인 *Bacillus cereus*의 성장 저해능은 0, 20% 에탄올 추출물에서는 저해활성이 거의 나타나지 않았으나 40~99.5% 에탄올 추출물에서는 12시간까지 생장이 억제되다가 시간이 경과함에 따라 생장이 다소 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 2A). *Micrococcus luteus*에서도 0, 20% 에탄올 추출물은 성장 저해 활성이 나타나지 않았으나 40~99.5% 에탄올 추출물은 해당 균주에 대한 생장이 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 40% 에탄올 추출물에서 12시간 이후 다소 성장하는 반면 60~99.5% 에탄올 추출물은 24시간까지 성장 저해 활성이 유지되었다(Fig. 2B). 그람 음성균의 성장 저해능은 그람 음성균에 비해 다소 낮은 활성을 보였다. *Pseudomonas aeruginosa*의 저해활성은 양성대조군으로 사용한 tetracycline과 streptomycin에 비해 낮은 활성이었으나 추출물의 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량과 비슷한 경향으로 단계적으로 성장 저해활성이 나타났다(Fig. 2C). *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 또한 *Pseudomonas aeruginosa*의 저해활성과 비슷한 경향이 확인되었다(Fig. 2D). 식물의 2차 대사산물이나 그 유도체는 미생물 성장을 제어할 수 있다고 보고하였다(Mitscher et al. 1980). 본 실험에서는 돌외 차 추출물의 페놀 및 플라보노이드 함량에 의존한 성장 저해활성을 보였고 2차 대사산물 중에서도

페놀성 화합물에 의해 성장 억제가 나타난 것으로 사료된다. An (2001)과 Kim and Kim (2016)의 연구에서 페놀성 화합물이 높을 경우 항균 활성이 더 높게 나타난다는 연구와 일치하는 결과였다. Lee and Shin (1991)은 여러 식물들의 물과 에탄올 추출물의 항균활성을 비교하였을 때 대부분의 에탄올 추출물이 더 높은 항균활성을 가진 것으로 보고하였다. 이러한 결과는 에탄올 용매가 페놀성 물질 추출에 유리하기 때문에 나타난 결과로 판단된다.

적요

본 연구는 페놀 및 플라보노이드의 총 함량과 생리 활성에 대한 다양한 농도의 에탄올 추출 효과를 비교하기 위해 수행하였다. 추출물의 총 페놀 함량은 35.54~71.52 mg GAE/g 범위였다. 용매의 에탄올 농도가 증가함에 따라 페놀 함량이 높았고 80%와 99.5%의 에탄올 추출물에서 최고 함량이 확인되었다. 추출물의 총 플라보노이드 함량은 페놀 함량의 경향과 유사하였다. 항산화 실험으로 DPPH, nitric oxide, superoxide, hydroxyl radical 소거능과 TEAC, FRAP, ORAC를 측정하였다. Radical 소거능은 물이나 99.5% 에탄올 추출물보다 에탄올 수용액 추출물의 활성이 우수하였다. TEAC와 FRAP은 에탄올 농도 의존적인 경향으로 높은 값이 나타났고 ORAC는 40~80% 에탄올 추출물이 높은 활성을 보였다. 돌외 잎 차의 항산화능을 검토한 결과 측정 방식에 따라 다른 경향이 확인되었다. 그리고 대부분의 실험에서 물 또는 99.5% 에탄올 추출물의 활성이 상대적으로 낮았다. α-Glucosidase 저해활성은 80%, 99.5% 에탄올 추출물에서 가장 높은 활성이 확인되었고, 미생물 저해활성 또한 동일한 결과

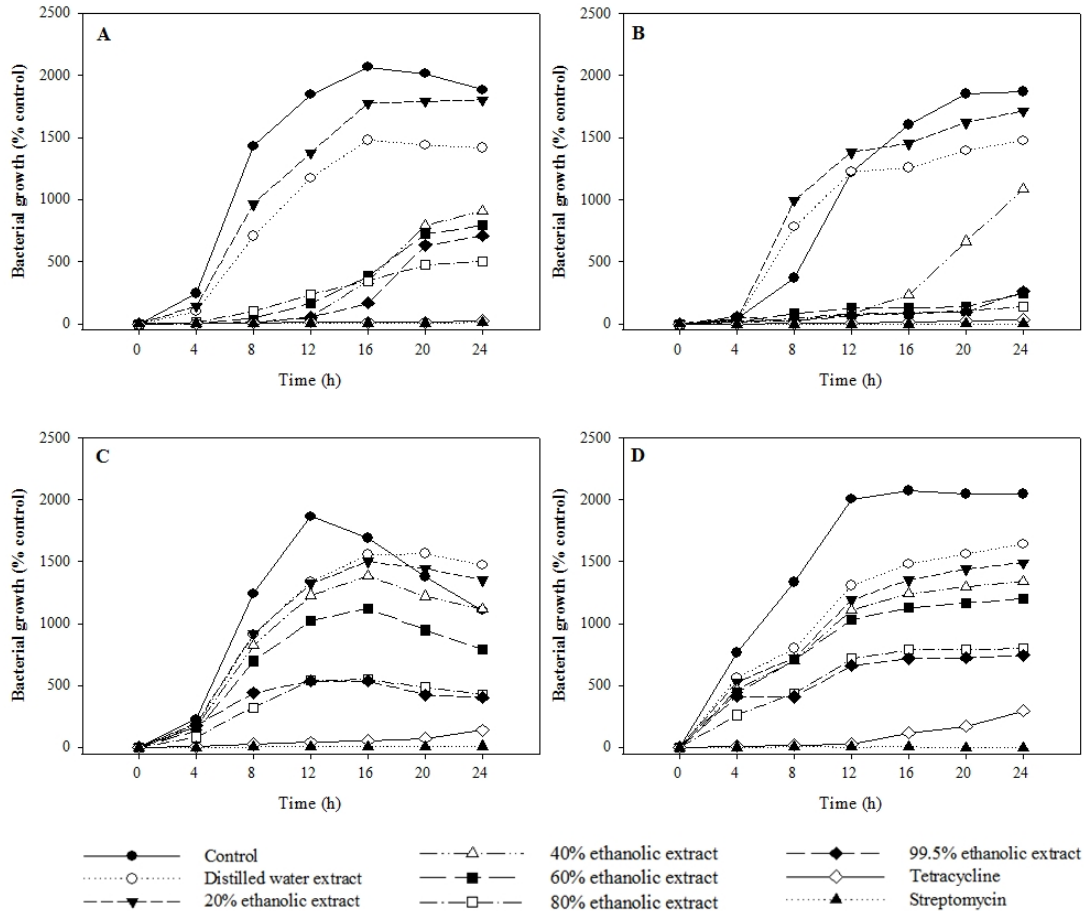


Fig. 2 Bacterial growth inhibition activity of the extract from Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves tea with different ethanol concentrations (A) the growth curve of *Bacillus cereus*, (B) the growth curve of *Micrococcus luteus*, (C) the growth curve of *Pseudomonas aeruginosa*, (D) the growth curve of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*

를 보였다. 따라서 차의 항산화 활성과 생리활성을 복합적으로 고려할 때 80% 에탄올로 추출하는 것이 적절한 것으로 사료된다. 이러한 결과를 토대로 동의 차의 식품개발에 있어 기초자료로 활용될 수 있다고 생각된다.

사 사

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 지역특화산업 육성사업(R0003895)으로 수행된 연구결과입니다.

References

An BJ (2001) Effect of inhibition on glucosyltransferase and antimicrobial activity of polyphenol fraction of gallnut and red grape husk. *Korean J Food Preserv* 8:217-223
 Althaus JS, Oien TT, Fici GJ, Scherch HM, Sethy VH and VonVoigtlander PF (1994) Structure activity relationships of

peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 83:243-254
 Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78(2):547-581
 Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Bio Chem* 39:70-76
 Blois MS (1958) Antioxidant determinations by use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
 Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281:9-19
 Huang WY, Cai YZ and Zhang Y (2009) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr cancer* 62(1):1-20
 Hwang CR, Oh SH, Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Shin YS, Lee JS and Jeong HS (2011) Chemical composition and antioxidant activity of Deoduk (*Codonopsis lanceolata*) and Doragi (*Platycodon grandiflorum*) according to temperature. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(6):798-803
 Kim JS, Kim KC (2016) Antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities of *Tradescantia pallida*(Rose) Hunt leaf extract and

- fractions. Korean J Med Crop Sci 24:222-227
- Kim KC, Kim JS (2018) Effect of ethanol solvent concentration on antioxidant activity of Dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) leaves extracts. J Adv Eng and Tech 11:3 197-203
- Kim YE, Kim IH, Jung SY and Jo JS (1996) Changes in components and sensory attribute of the oil extracted from perilla seed roasted at different roasting conditions. Agri Chem Biotech 39:118-122
- Kim YS, Hwang JW, Park PJ and Jeong JH (2014) Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Chrysanthemum boreale* on *t*-BHP induced oxidative stress in Chang cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 43(1):60-66
- Ko HM, Eom TK, Song SK, Jo GY, Kim JS (2017) Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities and antioxidant effects of extracts from different parts of *Hypochoeris radicata*. Korean J Med Crop Sci 25:139-145
- Lee BW and Shin DH (1991). Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. Korean J Food Sci Technol 23(2):200-204
- Lee JM, Park JH, Park HR and Park EJ (2010) Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of *Strychnos nux-vomica* extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 39(9):1243-1248
- Liu J, Zhang L, Ren Y, Gao Y, Kang L and Qiao Q (2014) Anticancer and immunoregulatory activity of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice. Int J Biol Macromol 69:1-4
- Lu Y, Du Y, Qin L, Wu D, Wang W, Ling L, Ma F, Ling H, Yang L, Wang C, Wang Z, Zhou X and He Y (2018) Gypenosides altered hepatic bile acids homeostasis in mice treated with high fat diet. Evid Based Complement Alternat Med 2018, 8098059
- Megalli S, Davies NM and Roufogalis BD (2006) Anti-hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. J Pharm Pharm Sci 9(3):281-91
- Mitscher LA, Park YH, Clark D and Beal JL (1980) Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *typica*. J Nat Prod 43(2): 259-269
- Moon GS, Kwon TW and Ryu SH (2003) Comparison of antioxidative activities of soybean components by different assays. Korea Soybean Digest 20(1):28-36.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK and Kumar MR (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. J Control Release 113(3):189-207
- Rice-Evans C, Miller N and Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 2(4):152-159
- Ryu KD, Chung HW, Kim KT and Kwon JH (1997) Optimization of roasting conditions for high-quality *Polygonatum odoratum* tea. Korean J Food Sci Technol 29:776-783
- Won BY, Shin KY, Ha HJ, Yun YS, Kim YR and Lee HG (2015) Changes in Nutritional Composition of Dropwort (*Oenanthe javanica*) Ethanol Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 44(6):882-887
- Xu ML, Hu JH, Wang L, Kim HS, Jin CW and Cho DH (2010) Antioxidant and anti-diabetes activity of extracts from *Machilus thunbergii* S. et Z. Korean J Med Crop Sci 18(1): 34-39
- Xu YQ, Ji WB, Yu P, Chen JX, Wang F and Yin JF (2018) Effect of extraction methods on the chemical components and taste quality of green tea extract. Food Chem 248:146-154
- Zulueta A, Esteve MJ and Frigola A (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 114:310-316