



Inhibition effect against elastase, collagenase, hyaluronidase and anti-oxidant activity of thinning Green ball apple

Yu-Jin Go¹ · Ye-Eun Kim¹ · Hyun-Nam Kim¹ · Eun-Ho Lee¹ · Eun-Bi Cho¹ · Akhmadjon Sultanov¹ · Soon-Il Kwon² · Young-Je Cho¹

그린볼 사과(Green ball apple; *Malus pumila* Mill.) 적과의 항산화 및 elastase, collagenase, hyaluronidase 저해 효과

고유진¹ · 김예은¹ · 김현남¹ · 이은호¹ · 조은비¹ · Akhmadjon Sultanov¹ · 권순일² · 조영제¹

Received: 22 November 2019 / Accepted: 22 January 2020 / Published Online: 31 March 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract In this study, the anti-oxidative, health functional, and beauty food activities of water and ethanol extracts from newly bred Ruby S apple (*Malus pumila* Mill.). The results of measuring the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity by treating the phenolic compound with thinning green ball apple at a concentration of 50-200 µg/mL showed that the water and ethanol extracts at a concentration of 200 µg/mL showed 94.69 and 92.24%, respectively. 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activities showed 100.30 and 99.16%, respectively, in 200 µg/mL of water and ethanol extracts. The water and ethanol extracts of Green ball showed antioxidant protection factor of 1.76 PF 1.76, respectively. The water and ethanol extracts showed 101.46 and 99.64% anti-oxidative effect on thiobarbituric acid reactive substances at phenolic concentration of 200 µg/mL. The water and ethanol extracts showed 33.28 and 32.14% hyaluronidase inhibition, respectively, at phenolic concentration of 150 µg/mL. The water and ethanol extracts showed 47.33 and

40.92% elastase inhibition and 46.19 and 65.58% collagenase inhibition at phenolic concentration of 200 µg/mL, respectively. About these experiments, thinning Green ball apple was found to exhibit anti-oxidation activity as well as hyaluronidase, elastase and collagenase inhibitory activities. Therefore, thinning Green ball apple can be considered a potential sources for new functional materials.

Keywords Anti-oxidant · Collagenase · Elastase · Hyaluronidase · Thinning green ball apple

서론

현대 사회에는 항노화에 관한 관심이 상승하는 추세인 가운데 천연물질을 이용한 항산화 원료개발의 의미는 향상되고 있으며 최근에는 아름다움을 중요시 여기고 있는 사회적 관심에 초점을 맞추어 노화를 늦추거나 미백 효과 또는 주름 개선을 갖는 천연의 항노화 기능성 화장품이 이목을 끌고 있다[1]. 노화는 모든 생물체에서 필연적으로 일어나는 자연현상이며 피부노화는 내외적인 복합요인에 의해 노화가 일어나는데, 내적인 요인은 피부노화를 피할 수 없는 자연적인 규율이며 중력, 체내분비의 기능변화 등을 포함하고 외적인 요인은 주로 환경의 영향을 많이 받는데 먼지, 자외선, 기후 등의 요인을 포함한다[2]. 이러한 외적인 요인 중에 자외선과 호흡을 통해 형성되는 활성산소는 피부노화의 가장 중요한 요인이 되며 활성산소는 조직 및 피부세포 손상을 주도한다[3]. 활성이 큰 산소 중에는

Young-Je Cho (✉)
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

¹School of Food science & Biotechnology, Kyungpook National University, 80 University Street, Bukgu, Daegu 41566, Republic of Korea

²Apple Research Institute, NIHHS, RDA, Gunwi 39000, 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.

superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical이 있다[4]. 이러한 활성산소는 피부 항산화 방어망을 파괴하여 항산화제와 산화제의 사이에 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 하여 산화적 스트레스를 형성하고, 이것은 단백질 산화, 세포간 지질 성분을 파괴하고 DNA산화와 melanin생성반응 촉진과 같은 생체 구성성분들을 손상시키고 이로 인해 주름생성, 탄력감소 및 주근깨·기미 발현 등의 피부노화를 가속화한다[3]. 따라서 이러한 활성산소 감소를 통한 피부노화억제 및 생체방어 등에 대한 연구가 진행되고 있다.

생리활성 효소에는 피부주름을 일으키는 효소로 collagen을 분해하는 효소나 피부탄력을 유지해주는 elastin을 분해하는 효소 그리고 염증 유발에 관계가 있는 효소 등이 있는데, 이러한 효소들은 천연물질에 함유된 기능성 성분에 의해 억제되어지기도 하며 이런 성분을 이용해 노화 방지용 식품 및 미용식품을 목적으로 한 다양한 제품군이 개발되고 있다[5].

사과는 장미과로 분류되어지는 작은 낙엽성의 나무로서 아시아, 유럽 및 북아메리카의 북반구에서 재배되며, 사과에는 당류, 비타민류, 식이섬유 및 phenolic compounds이 다량 함유되어 있다[6]. 또한 사과에는 다양한 종류의 polyphenol 화합물이 존재하는데 이 물질은 사과의 항산화 활성에 주요한 역할을 하는 천연물질이고[7] 항알러지, 항염증, 주름개선 등의 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며[6], 동맥경화나 고혈압과 같은 성인병 예방에 효과가 있다고 알려져 있다[8].

이러한 항산화능과 성인병에 관여하는 성분은 사과에 존재하는 비타민 C라기보다는 파이토케미컬인 퀘세틴, 에피카테킨, 프로시아니딘, B2가 강력한 효능을 보이는 것으로 알려졌다[6]. 과실은 수확의 시기나 성숙에 따라 성분 및 이로 인한 생리활성에 특이성을 가진다. 블랙 라스베리 과실은 자유라디칼 소거능 및 환원력 모두 과실이 성숙함에 따라 감소하며, 총 페놀 함량 및 비타민 함량 역시 과실이 성숙함에 따라 감소하는 것으로 알려졌다[5] 딸기의 경우 품종에 따라서 미숙과의 항산화 물질 및 항산화능이 차이가 나는 것을 확인 하였다. 이상의 연구에서의 결과에 의하면 미숙과의 경우 완숙과에 비해 항산화 효능이 높다는 것을 알 수 있다. 하지만, 사과과실의 재배에서 과육의 품질을 향상시키고 과육크기를 조절할 목적으로 1, 2차 적과를 행하게 되는데, 이때 발생하는 적과의 이용은 극히 제한적으로 활용되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서 신품종인 그린볼 사과 재배 시 발생하는 적과의 이용가치를 높이기 위하여 적과가 갖는 다양한 생리활성을 검토하여서 높은 가치의 기능성 소재로서 개발하고자 시도하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용된 시험 재료는 경북 군위군 사과연구소에서 교배조합으로 후지(Fuji; 부분)와 골든데리셔스(Golden delicious; 모본)을 이용, 교배한 신품종 품종인 그린볼 사과의 2차 적과를 사용하였다. 시료는 그린볼 사과나무로부터 적과 과정에서 숙아져 버려지는 적과 열매를 수거하여 열매에서 이물질을 제거 후, 실험 재료로 사용하였다. 그린볼 사과 적과 시료는 작게 토막

낸 후 동결건조(freeze dryer, FD8518, Ilshinbiobase, Yangju, Korea)하여 수분을 제거하고, 40 mesh로 파쇄하고 4°C의 저온 고에 보관하여 시료로 이용하였다.

그린볼 사과 적과 추출물 제조

생리 활성 측정에 사용하기 위한 추출물을 제조할 때 물 추출물은 그린볼 사과 적과의 분말 1g을 200 mL 증류수(distilled water)에 침지하고 추출물이 100 mL가 되도록 가열한 뒤 상온으로 냉각하여 24시간 shaking incubator를 이용하여 4°C에서 교반 추출하였다. Ethanol 추출물의 제조는 60% ethanol 100 mL에 그린볼 사과 적과 분말 1g을 넣고 24시간 동안 교반 추출을 하였다. 그 후, Whatman No. 1 filter paper (Whatmaninc., Piscataway, New jersey, USA)로 추출물을 여과하고, rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Tokyo, Japan)을 사용하여 농축해서 시료로써 이용하였다.

Total phenolic compound 정량

Total phenolic compound 정량은 Folin와 Denis의 방법[9]에 따라 측정하였고, 시료 1 mL에 증류수 5 mL, 95% ethanol 1 mL와 1 N Folin-Ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 vortex하고 5분 동안 반응시킨 뒤 Na₂CO₃ 1 mL를 넣고 1시간 이내에 725 nm의 파장에서 흡광도(Optical density, OD)를 측정하여 gallic acid 표준곡선을 이용해 양을 환산하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 저해 효과

DPPH radical 소거능은 Blois이 제시한 방법[10]에 따라 측정하였다. 그린볼 사과 적과로부터 추출한 phenolic compound를 50, 100, 150, 200 µg/mL의 농도로 조절하여 시료를 만들고 이를 반응구로 하여 각 시료 용액 1 mL와 60 µM DPPH 3 mL를 혼합하여 vortex하고 실온에서 15분 동안 방치시킨 후, 517 nm에서 OD값을 확인하였다. DPPH radical 소거능은 시료 추출물의 반응구와 대조구의 OD값 차이로 계산하여 나타내었다.

2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical 저해 효과

ABTS radical 소거능은 Fellegrin 등이 제시한 방법[11]에 따라 측정하였다. 먼저 140 mM K₂S₂O₈ 88 µL와 7 mM ABTS 5 mL를 혼합하여 암실에서 약 15시간 동안 반응시켜서 radical을 형성하였다. 이것을 ethanol과 약 1:88의 비율로 섞고 난 이후 734 nm에서 대조구 OD값이 0.7±0.02이 되게 조절한 ABTS solution을 이용하였다. 반응구에는 ABTS solution: 그린볼 사과 적과 분말의 phenolic compound를 50, 100, 150, 200 µg/mL의 농도로 조절한 시료용액을 (4 mL : 200 µL) 비율로 혼합하였고 대조구에는 시료를 대신하여 증류수를 200 µL 첨가하여 vortex하고 1.5분 동안 반응시킨 후, 734 nm에서 OD값을 확인하였다. ABTS radical 소거능(%)은 (1-반응구의 OD값/대조구의 OD값)×100으로 계산하였다.

Antioxidant protection factor (PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty이 제시한 방법[12]에 따라 측정하였다. 즉, evaporator용 수기에 50 mL의 chloroform에 30 mg의 β-carotene을 녹인 용액 1 mL를 넣고 40°C water bath에서

chloroform을 완전히 증류시켜 evaporator용 수기 바닥에 있는 침전물에 184 μL tween 40, 20 μL linoleic acid와 0.1% H_2O_2 50 mL를 이용해 완전히 녹여 emulsion 용액을 만들고, 그린볼 사과 적과 분말의 phenolic compound를 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 조절한 시료 100 μL 에 각각 5 mL의 emulsion을 혼합한 뒤 50 °C, 암실에서 30분간 반응시키고 냉각한 다음, 470 nm에서 OD값을 측정하여 PF값은 반응구의 OD값 대비 대조구의 OD값으로 나타내었다.

Thiobarbituric acid reaction substance (TBARs) 저해 효과

Buege와 Aust 방법[13]으로 TBARs 값을 측정하였다. 1% Tween 40과 1% linoleic acid를 동량으로 섞어서 제조한 emulsion 용액의 0.8 mL를 0.2 mL의 시료 용액과 혼합하고 대조구에는 0.2 mL의 증류수를 시료로 대신하였다. 50 °C의 water bath를 이용하여 12시간 정도 반응시킨 후, 1 mL의 반응액에 4 mL의 TBA reagent를 넣고 15분 동안 끓는 물에 증탕으로 가열하고 10분 동안 냉각시킨 뒤, 원심 분리를 2,000 rpm으로 20분 동안 한 후 상등액을 532 nm의 파장에서 흡광도를 측정했다. 그린볼 사과 적과의 저해율(%)은 $100 \times (1 - \text{반응구의 TBARs } \mu\text{M} / \text{대조구의 TBARs } \mu\text{M})$ 의 식을 이용하여 값을 내었다.

Hyaluronidase (HAase) 저해 효과

HAase의 저해 효과를 측정하기 위해 Dorfman과 Ott의 방법[14]을 이용하였다. 반응구의 경우에는 그린볼 사과 적과 분말의 phenolic compound를 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 조절한 시료 0.25 mL와 20 mM sodium phosphate phosphate buffer (pH 6.9)에 용해시킨 HAase (1,000 U/mL) 0.25 mL를 섞은 후 water bath를 이용해 38 °C에서 5분 동안 반응시키고 0.3 M phosphate buffer (pH 5.3)에 용해시킨 기질(4 mg/mL)을 0.25 mL 넣고 다시 38 °C에서 45분 동안 반응시키고 난 이후에 0.04 M acetate buffer (pH 3.7)에 용해시킨 알부민 용액 2.5 mL를 첨가하였다. 그 후 5분동안 방치하고 600 nm에서 투과율을 측정하였다. 대조구로는 시료를 대신하여 증류수 0.25 mL를 넣고 반응시켰다. 저해율(%)은 $(1 - \text{시료의 투과율} / \text{대조구의 투과율}) \times 100$ 의 식을 이용하여 계산하였다.

Elastase 효소저해 효과

Kraunsoe 등의 방법[15]으로 Elastase 저해활성 효과를 측정하였다. 그린볼 사과 적과 분말의 phenolic compound를 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 조절한 시료 0.1 mL에 pH 8.0인 0.2 M의 Tris-HCl buffer 1 mL와 0.8 mM의 기질액 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide 0.1 mL, 효소 용액 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 0.1 mL를 혼합하고, 대조구에는 증류수 0.1 mL를 시료로 대신하여 넣어서 20분 동안 37 °C에서 반응시키고 5분 동안 냉각시킨 뒤 410 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그린볼 사과 적과의 저해율(%)은 $(1 - \text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 의 식을 이용하여 값을 나타내었다.

Collagenase 효소저해 효과

Collagenase 저해 효과는 Wunsch와 Heidrich가 제시한 방법[16]에 따라 측정하였으며, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에

4 mM CaCl_2 를 첨가한 후 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg를 0.3 mg/mL의 농도로 녹인 기질 용액 0.25 mL와 그린볼 사과 적과 분말의 phenolic compound를 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 조절한 각 시료 용액 0.1 mL를 섞은 뒤, 0.2 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분 동안 반응시킨 뒤 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 ethyl acetate 2 mL를 넣고 vortex하고 320 nm의 파장에서 OD값을 확인하였다. Collagenase 저해 효과는 시료용액의 반응구와 대조구의 OD값 차이로 계산하여 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였고 자료의 통계처리는 SPSS 23 for windows (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 평균 \pm 표준편차 (average \pm standard deviation)로 표시한 후 Duncan's multiple range test, one-way ANOVA를 실시하여 시료 추출물 간의 유의차를 $p < 0.05$ 수준으로 하여 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

그린볼 사과 적과로부터 분리한 고형분과 phenolic compound의 활성 비교

그린볼 사과 적과로부터 분리한 고형분(solid)과 phenolic compound가 생리활성 효과에 어떤 영향을 미치는지 비교하기 위해 ABTS radical 소거능을 측정한 결과, Fig. 1A와 B에서처럼 그린볼 사과 적과로부터 분리된 phenolic compound는 물 추출물 100과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 94.16, 99.6%의 radical 소거능을 나타내었고, ethanol 추출물 100과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 각각 86.94, 100.10%의 radical 소거능을 나타내었다. 반면 그린볼 사과 적과로부터 분리한 water soluble solid 100과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 각각 11.63, 16.38%의 radical 소거능을 나타내었고, ethanol soluble solid의 100과 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 17.86, 30.58%의 radical 소거능이 나타내었다. 따라서 그린볼 사과 적과로부터 분리된 phenolic compound의 경우에는 물, ethanol 추출물 모두 높은 radical 소거능을 가지고 있지만 그린볼 solid의 경우에는 물, ethanol 추출물 모두 낮은 radical 소거능을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 그린볼 사과 적과의 생리활성에는 phenolic compound가 관여하는 것으로 확인되어 향후 실험에서는 phenolic compound를 대상으로 진행되었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 DPPH radical 저해 효과

DPPH radical 소거능은 지질과 산화 반응에서 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical에 전자를 공급하여 연쇄반응을 중지시킨다. 산화성 free radical은 지질, 단백질, 등 인체 내 물질과 결합하여 각종 질병 및 노화를 일으키는 척도가 되므로 radical 소거능은 인체의 질병과 노화 방지에 관여한다고 알려져 있다. DPPH법은 항산화 물질의 DPPH radical 소거능으로 인해 DPPH가 환원되어 보라색에서 노란색으로 색이 탈색되는 정도를 이용하여 항산화 효과를 측정할 수 있는 척도로 알려져 있

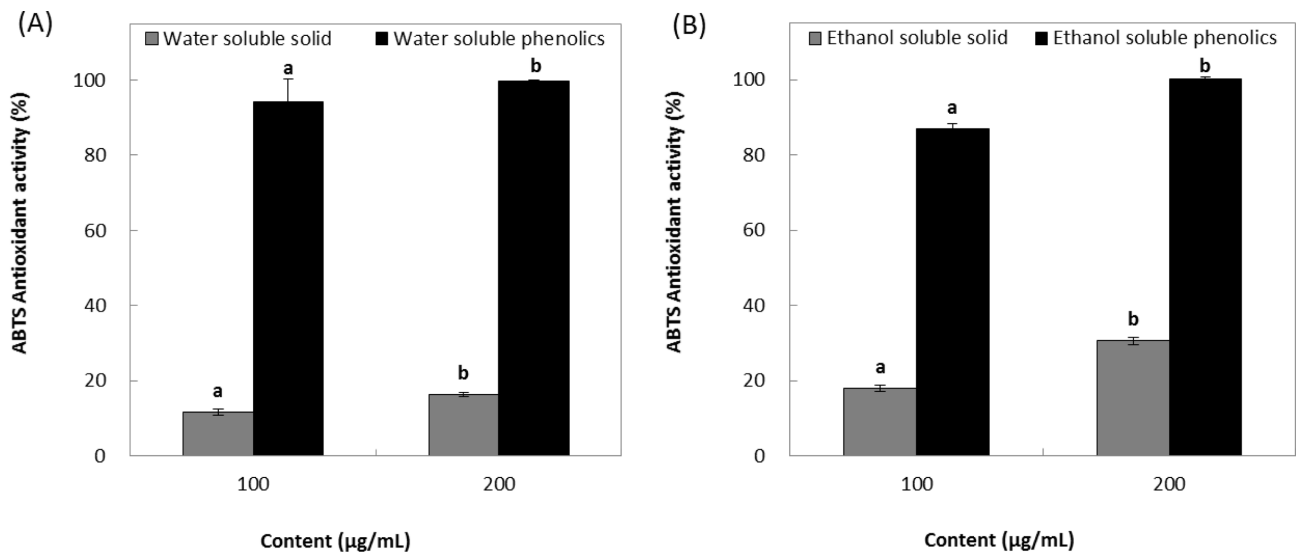


Fig. 1 ABTS activity on solid and phenolic from green ball water extract (A) and ethanol extract (B). Means with different superscript letters (a-b) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

다[17]. 그린볼 사과 적과 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 측정된 결과 Fig. 2A와 같이 phenolic compound 50-200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 각각 89.16-94.69%와 90.75-92.24%의 DPPH radical 소거능을 나타냈으며, positive control로 사용한 butylated hydroxytoluene (BHT)의 DPPH radical 소거능인 DPPH 67.93-77.11%보다 높은 DPPH radical 소거능을 나타낸다. Kang 등[18]이 참당귀의 물과 methanol 추출물이 500과 1,000 µg/mL 농도에서 각각 47.1, 66.3, 45.6, 81.5%의 DPPH radical 소거능을 나타낸다고 보고한 것과 비교했을 때 그린볼 사과 적과 추출물의 DPPH radical 소거능이 더 우수하다고 판단되었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 ABTS radical 저해 효과

ABTS 방법은 ABTS의 양이온 radical의 흡광도는 항산화 물질에 의해 억제되어서 특유의 청록색으로 색이 변하는 현상을 사용한 방법으로[19], ABTS radical 소거능은 aqueous phase와 organic phase에 적용 가능한 방법이고 또 hydrogen donating antioxidants와 chain breaking antioxidants를 측정할 수 있다 [20]. 그린볼 사과 적과 추출물을 이용하여 ABTS radical 소거능을 측정된 결과 Fig. 2B와 같이 phenolic compound 50-200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 각각 56.12-100%와 53.15-99.16%의 ABTS radical 소거능이 나타내며, positive control로 사용한 페놀계 산화방지제의 일종인 BHT[21]의 ABTS radical 소거능인 28.84-69.62%보다 높은 ABTS radical 소거능을 나타내었다. Kim과 Kang의 연구결과[22]에 따르면 참외 줄기·잎의 ethanol 추출물 100과 200 µg/mL 농도에서 각각 41.4와 55%의 ABTS radical 소거능을 나타냈다고 보고한 것과 비교했을 때 그린볼 사과 적과 추출물의 ABTS radical 소거능이 더 우수하다고 판단되었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 PF 측정

β-Carotene은 지용성 비타민이므로 지질 산화과정 중 생성되는

peroxy radical과 β-carotene이 반응하여 불활성물이 생성되고, 이 물질이 free radical에 의한 연쇄 반응을 중지시켜 singlet oxygen을 억제한다[23]. PF는 β-carotene이 산화될 때의 변화를 이용한 항산화 효과 측정법으로, 지방산이 산패될 때 생성된 물질에 의해 β-carotene이 산화되어 특유의 색을 감소하는 것을 측정하여 지방산의 초기 산패 여부를 알 수 있다[24]. 그린볼 사과 적과 추출물로 PF를 측정된 결과 Fig. 2C에서와 같이 phenolic compound 50-200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 각각 1.38-1.76 PF와 1.23-1.76 PF의 값을 나타냈으며, positive control로 사용한 BHT의 1.07-1.29 PF보다 높은 값을 나타내었다. Lim 등[25]이 야생 곰취 잎 물 추출물이 200 µg/mL에서 1.02 PF를 나타내었다고 보고한 결과와 비교하였을 때, 그린볼 사과 적과 추출물의 지용성 물질에 대한 항산화 효과가 더 우수하다고 판단되었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 TBARS 저해 효과

지방의 산패도를 나타내는 TBARS 값은 TBA 시약과 반응해서 붉은색을 나타내는 malondialdehyde의 생성량을 측정된 것이다 [26]. 50-200 µg/mL phenolic 농도에서 TBARS를 측정된 결과는 Fig. 2D와 같이 물 추출물에서는 91.80-101.46%의 활성을, ethanol 추출물에서는 95.08-99.64%의 활성을 나타냈으며, 대조구인 BHT는 97.34-100.48%의 활성을 나타내었다. Kim 등[27]이 노간주 나무를 500 µg/mL 농도의 물 추출물과 ethanol 추출물의 항산화를 측정하였을 때 각 55와 71%의 항산화 활성 효과를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 그린볼 사과 적과 추출물이 높은 지용성 항산화능을 가진 것을 확인할 수 있었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 HAase 저해 효과

히알루론산(hyaluronic acid; HA)은 조직내의 간질에 널리 분포되어있는 고분자 다당이다[28]. HA는 섬유아 세포에서부터 산출되고, 표피와 진피에 있어서 주요한 세포외기질(extracellular matrix)로서 존재하는 글루쿠론산(glucuronic acid)와 글루코사민

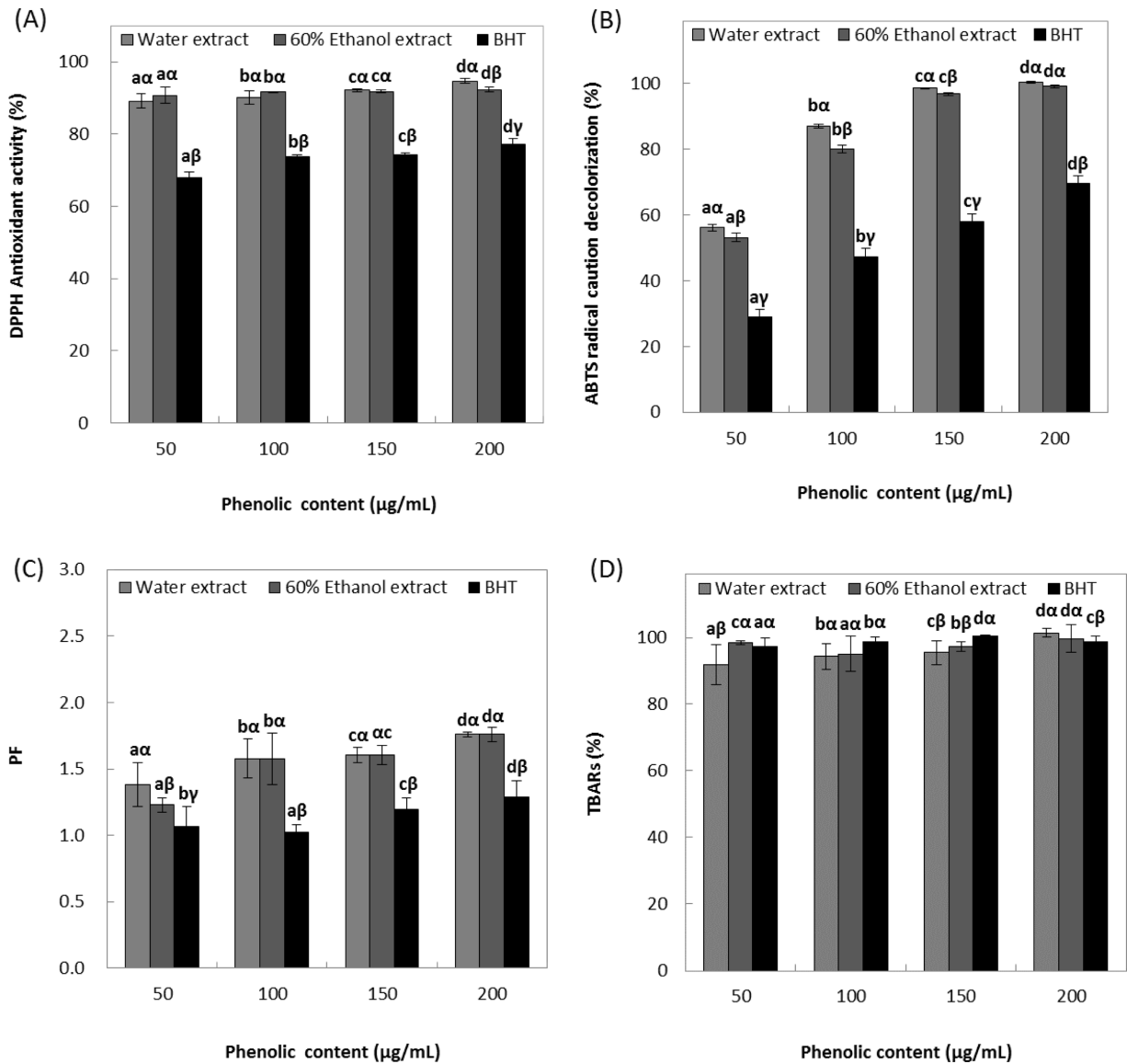


Fig. 2 antioxidant activity of water, 60% ethanol extracts from *Malus pumila* Mill. (A): DPPH, (B): ABTS, (C): PF, (D): TBARs. Means with different superscript letters (a-d), (α-γ) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

(glucosamine)이 반복 연결된 점액성 mucopolysaccharide로서 세포간 분자에서 3차원적 가교역할을 한다[20,28]. 고분자의 HA의 경우 염증 형성에서 중요 원인인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는데, 그와 다르게 HA 분해 산물이나 저분자의 HA의 경우는 상처를 치유하는 과정에서 fibrosis, deposition, collagen, inflammation을 늘어나게 하는 것으로 알려져 있으며, 류머티즘 관절염 등과 같은 염증환자에게서 고농도로 관찰되고 암세포 전이나 알레르기 반응 등에도 관여한다고 보고되었다[29]. 그린볼 사과 적과 추출물을 이용하여 HAase의 저해활성을 측정된 결과 Fig. 3A와 같이 phenolic compound 50-200 µg/mL 농도에서 물 추출물은 28.38-35.04%의 HAase 저해 효과를 나타내었으며, ethanol 추출물 또한 물 추출물과 비슷한 저해 효과를 나타내었다. Kang 등[30]의 연구에 따르면 오가피, 우슬, 갈근, 복분자도 10% 이상의 HAase의 활성을 나타내었다

고 알려져 있다. 이러한 결과를 비교하면 오가피, 우슬, 갈근, 복분자보다 그린볼 사과 적과가 더 높은 항염증과 아토피 억제 효과를 나타낼 것이라고 판단되었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 elastase 저해 효과

인간의 중성구 과립구 안에 있는 elastase가 피부의 탄력과 진피 속 피부 구조를 지탱하는 일을 하는 주요한 단백질인 elastin을 분해하는데[31], 이 효소는 이상조직에서 활성이 매우 높아 조직을 파괴하는데 주요 원인으로 작용한다[32]. 자외선과 같은 환경적 원인으로 인해 elastase의 활성이 증가하면 피부의 진피에 있는 elastin 그물망으로 된 구조가 끊어지게 되고 감소된 피부의 탄력섬유로 인해 피부주름이 증가한다[7,33]. 이러한 피부주름을 해결하는 작용을 나타내는 것이 elastase 저해제이다[34]. Elastase 저해제로 알려진 것 중 ursolic acid가 대표적이며,

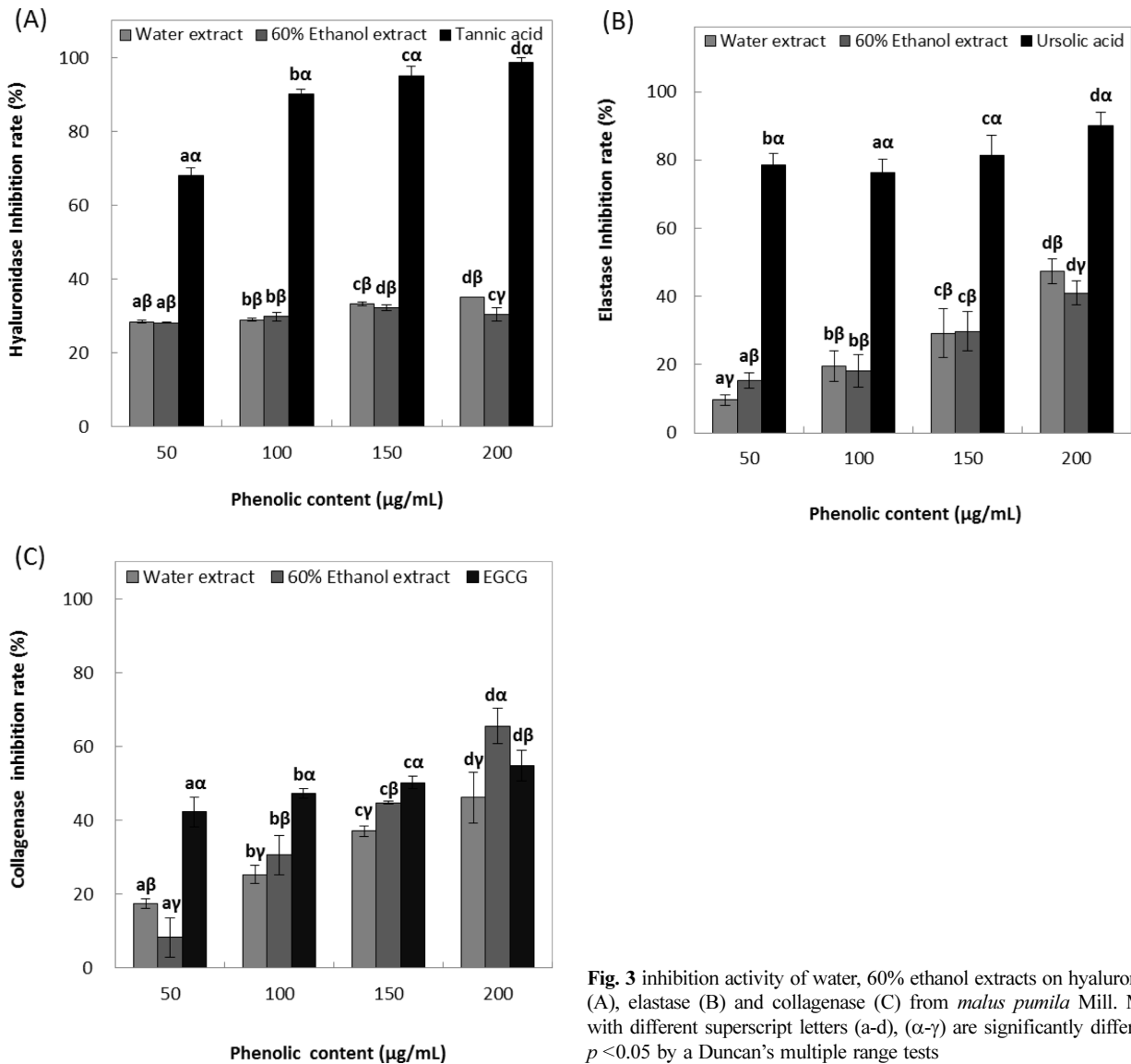


Fig. 3 inhibition activity of water, 60% ethanol extracts on hyaluronidase (A), elastase (B) and collagenase (C) from *malus pumila* Mill. Means with different superscript letters (a-d), (α-γ) are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

처진 피부와 주름을 완화시키는 효과가 있다고 한다[32]. Ursolic acid를 대조구로 하여 그린볼 사과 적과의 elastase에 대한 저해 활성을 측정해본 결과 Fig. 3B와 같이 phenolic compound 농도가 50-200 µg/mL에서 물과 ethanol 추출물은 각각 9.61-47.33%와 15.37-40.92%의 저해 효과를 나타냈다. 대조구인 ursolic acid는 76.40-89.99%의 저해 효과를 나타냈다. Lee 등 [35]이 자귀나무 잎 추출물 300 µg/mL 농도에서 elastase 저해 활성을 측정하였을 때 물 추출물과 ethanol 추출물 각 8과 7%를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 그린볼 사과 적과 추출물이 주름개선에 대한 기능성 소재로 활용될 가능성이 있다고 판단되었다.

그린볼 사과 적과 추출물의 collagenase 저해 효과

Collagen, elastin, hyaluronic acid, fibronectin 등 다양한 ECM 단백질은 피부 진피층의 구성성분이다. ECM 단백질 전체의 90%를 차지하는 collagen은 피부의 형태와 강도를 유지하는 역

활을 가진다. collagen은 다양한 ECM 단백질과 가교결합을 만들기 때문에 collagen 분해가 일어나면서 가교결합이 끊기면서 진피층의 부피가 줄어들어 주름이 발생하며, elastin도 기능을 잃게 되어 피부의 탄력이 감소한다. Collagen은 다른 ECM 단백질들과 비교하여 큰 부피를 가지기 때문에 collagenase에 의한 collagen의 분해는 피부 주름 생성에 큰 영향을 미친다고 할 수 있다[24]. 그린볼 사과 적과 추출물을 이용하여 collagenase 저해 효과를 측정한 결과 Fig. 3C와 같이 phenolic compound 50-200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 각각 17.49-46.19%와 8.30-65.58%의 저해값을 나타냈으며, positive control로 사용한 epigallocatechin-galate (EGCG)의 42.28-54.92%보다 낮은 값을 나타내지만, 시료가 단일 물질이 아닌 추출물임을 감안하면 우수한 효과를 가진다고 판단되었다.

또한 그린볼 사과의 성숙과 추출물로 연구한 Lee 등[36]의 결과와 그린볼 사과 적과 추출물의 항산화 및 생리활성 효과를 비교하였을 때 주름개선 효과를 나타내는 효소인 elastase,

collagenase 저해효과는 유사한 억제 결과를 나타내었지만, 항산화 및 HAase 억제효과에서는 더 우수한 결과를 나타내어 그린볼 사과 성숙도와 적과에 함유된 phenolic compounds 함량 차이에 의한 결과라고 예상되었으며, 위 연구 결과에 따라 적과에 함유된 성분을 활용하여 우수한 기능성의 제품에 적용 가능할 것이라고 판단되었다.

초 록

그린볼 사과 적과의 phenolic compound를 50-200 µg/mL 농도로 처리하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 94.69과 92.24%의 DPPH radical 소거능을 나타내었다. ABTS radical 소거능은 200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물에서 각각 100.30과 99.16%의 ABTS radical 소거능을 나타내었다. PF는 200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물에서 각각 1.76, 1.76 PF를 나타내었다. TBARs는 phenolic compound 농도가 200 µg/mL에서 물과 ethanol 추출물 각각 101.46, 99.64%의 항산화능을 나타내었다. 염증에 관련이 있는 HAase의 저해 효과를 측정한 결과 150 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 각각 33.28, 32.14%의 저해 효과를 나타내었다. 미용식품활성을 나타내는 elastase 저해활성을 측정해 본 결과 phenolic compound 농도가 200 µg/mL에서 물과 ethanol 추출물 각각 47.33, 40.92%의 저해 효과를 나타내었다. 피부의 주름과 탄력에 관련이 있는 collagenase 저해 효과를 측정한 결과 200 µg/mL 농도의 물과 ethanol 추출물은 각각 46.19, 65.58%를 나타내었다. 따라서 그린볼 사과 적과는 항산화, 항염증, 주름 개선 등 다양한 생리활성을 나타내는 기능성 소재로 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

Keywords 그린볼 사과 적과 · 엘라스타아제 · 콜라게나제 · 항산화 · 히알루로니다제

References

1. Shim JS, Kim SD, Kim TS, Kim KN (2005) Biological activities of flavonoid glycosides isolated from *Angelica keiskei*. *Korean J Food Sci Technol* 37: 78–83
2. Kim HC, Wu JD (2011) Review in the Effects Influencing Skin Aging and Its Prevention and Cure. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology* 9(1): 61–169
3. Hong JK (2009) A Study on Skin Aging Caused by Free-Radical and on Efficacy of Antioxidant Vitamins. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology* 7(2): 51–62
4. Jang JB, Park OR, Yun TE (2010) Free Radicals, Physical Performance, Aging and Antioxidants. *The Korea Journal of ideal Body & Beauty* 2(1): 19–27
5. Lee EH, Cho YJ (2018) Inhibitory activities of phenolic compounds isolated from *Chionanthus retusa* flower on biological enzymes. *Korean J Food Preserv* 25(1): 117–123
6. Kwon OJ (2016) Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of immature fruits of *Malus pumila* cv. Fuji. *Korean J Food Preserv* 23: 585–590
7. Vinson JA, Su X, Zubic L, Bose P (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315–5321

8. Lee EH, Kim YJ, Kwon SI, Kim JH, Kang IK, Kim BO, Cho YJ (2018) Functional properties of newly bred Green ball apple (*Malus pumila* Mill.). *Korean J Food Preserv* 25(7): 837–845
9. Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 12: 239–249
10. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200
11. 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
12. Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differ-transformed roots of anise (*Pimpinella ansisum* L.). *J Agric Food Chem* 47: 1779–1780
13. Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302–310
14. Dorfman A, Ott ML (1948) A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem* 172: 367–375
15. 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
16. Wunsch E, Heidrich HG (1963) Zur quantitativen bestim-mung der kollagenase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 333: 149–151
17. Ahn SI (2005) Antioxidative and physiological activities of some phenolic compounds. Dissertation, National University of Hankyong
18. Kang SA, Han JA, Jang KH, Choue RW (2004) DPPH Radical Scavenger Activity and Antioxidant Effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(7): 1112–1118
19. Kim YH, Lee YJ, Park SO, Lee SJ, Lee OH (2013) Antioxidant Compounds and Antioxidant Activities of Fermented Black Rice and Its Fractions. *Korean J Food Sci Technol* 45: 262–266
20. Lee EH, Kim BO, Cho YJ (2017) Inhibitory activities on biological enzymes of extracts from *Oplismenus undulatifolius*. *J Appl Biol Chem* 60: 101–108
21. Sung NE (1989) The Effect of BHA and BHT on Mixed Function Oxygenase of Liver Tissue. *Ewha medical journal* 12: 7–11
22. Kim HS, Kang YH (2010) Antioxidant Activity of Ethanol Extracts of Non-Edible Parts (stalk, stem leaf, seed) from Oriental Melon. *Korean J Plant Res* 23(5): 451–457
23. Chae JW (2012) Antioxidative Activity of Extracts from *Sambucus williamsii* var. *coreana*. *Korean J Plant Res* 25(4): 363–371
24. Lim SB (2018) Anti-oxidant and Enzyme Inhibition Activities of Freeze-dried Powder from *Cedrela sinensis* fruit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47(11): 1085–1092
25. Lim SB, Kim MW, Park KI, Lee EH, Kim YJ, Cho EB, Kim BO, Cho YJ (2018) Biological activity of wild *Ligularia fischeri* leaf extracts in the development of functional food materials. *Korean J Food Preserv* 25(3): 359–365
26. Joo SY (2013) Antioxidant activities of medicinal plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 512–519
27. Kim JH, Lee SY, Park JM, Park JH, Kwon OJ, Lee JY (2014) Antioxidant activity and inhibition activity against α-amylase and α-glucosidase of *Juniperus rigida* Sieb extracts. *Korean J Food Preserv* 21: 396–403
28. Kwon JY, Cheong SI (2005) Characterization of Hyaluronic Acid Membrane Containing Lactic Acid. *Membrane Journal* 15: 8–14
29. Lee EH, Hong SH, and Cho YJ (2017) Biological Activities of Extracts from Okkwang (*Castanea crenata*) Chestnut Bur. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46: 572–580
30. 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(6): 844–850
31. Lee JY, Yu MR, An BJ (2010) Comparison of biological activity between *Nelumbo nucifera* G. extracts and cosmetics adding *Nelumbo*

- nucifera* G. J Life Sci 20: 1241–1248
32. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Phytochem Photobiol* 74: 283–290
 33. Tsukahara K, Nakagawa H, Moriwaki S, Takema Y, Fujinura T, Imokawa G (2006) Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int J Dermatol* 45: 460–468
 34. Dewitt DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA, Smith WL (1981) Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 256: 10375–10382
 35. Lee YS, Kim BO, Kim NW (2014) Anti-wrinkle and antioxidant activity of the extract of *Albizia julibrissin* leaves. *J Invest Cosmetol* 10: 317–326
 36. Lee EH, Kim YJ, Kwon SI, Kim JH, Kang IK, Kim BO, Cho YJ (2018) Functional properties of newly bred Green ball apple (*Malus pumila* Mill.) *Korean J Food Preserv* 25: 837–845