

## 과화, 여성초, 익모초에서 효소 분해에 의한 항산화 활성 변화 연구

차배천

상지대학교 보건의료과학대학 제약공학과

### Study on the Change of Antioxidant Activity by Enzymatic Hydrolysis in *Sophora japonica* Linne, *Houttuynia cordata* Thunberg, *Leonurus japonicus* Houttuyn

Bae Cheon Cha

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University

Received: March 23, 2021

Revised: May 18, 2021

Accepted: May 28, 2021

**Correspondence to:** Bae Cheon Cha  
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju 26339, Korea  
Tel: +82-33-730-0554  
Fax: +82-33-738-7652  
E-mail: bccha@sangji.ac.kr

Copyright © 2021 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

**Objectives:** The enzymatic hydrolysis is one of the processing methods that improve its effectiveness on medicinal herbs. In this research, changes in ingredients and activity by enzymatic hydrolysis were studied.

**Methods:** For this study, a carbohydrate hydrolase such as viscozyme, which converts glycosides to aglycone, was applied to induce constituent changes in *Sophora japonica* Linne, *Houttuynia cordata* Thunberg and *Leonurus japonicus* Houttuyn. Changes in antioxidant activity were measured using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method, and changes in ingredients were analyzed by high performance liquid chromatography.

**Results:** As a result of enzymatic hydrolysis, the content of quercetin was increased from 1.26 mg/g to 29.66 mg/g in *Sophora japonica* Linne, from 0 mg/g to 0.66 mg/g in *Houttuynia cordata* Thunberg and from 0.43 mg/g to 0.71 mg/g in *Leonurus japonicus* Houttuyn. As a result of the antioxidant experimentation, the IC<sub>50</sub> of *Sophora japonica* Linne decreased from 5 ug/ml (MeOH extract) and 9.1 ug/ml (EtOAc fraction) to 3.0 ug/ml, *Houttuynia cordata* Thunberg decreased from 15.6 ug/ml (MeOH extract) and 13.6 ug/ml (EtOAc fraction) to 11.2 ug/ml, and *Leonurus japonicus* Houttuyn decreased from 14.4 ug/ml (MeOH extract) and 12.6 ug/ml (EtOAc fraction) to 10.2 ug/ml.

**Conclusion:** In conclusion, it was confirmed that glycoside rutin contained in the three medicinal herbs was changed to quercetin which is the aglycone, by the enzymatic hydrolysis using viscozyme. In terms of antioxidant activity, *Sophora japonica* Linne showed a significant antioxidant activity value that closes to the control group butylated hydroxyanisole. *Houttuynia cordata* Thunberg and *Leonurus japonicus* Houttuyn showed a minor increase in antioxidant activity.

**Key Words:** *Sophora japonica* Linne, *Houttuynia cordata* Thunberg, *Leonurus japonicus* Houttuyn, Enzymatic hydrolysis, High performance liquid chromatography, Antioxidants

## 서론

최근 노령화에 따라 다양한 성인병 질환이 발생하고 있는데 발병 원인의 하나로 호흡 과정에서 흡입된 산소 중 일부가 활성산소라고 하는 유독 작용을 하는 물질로

전환되어 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 이러한 활성산소종(reactive oxygen species)에는 체내 효소계나 환원 대사 등에 의해 생성되는 일중항산소나 superoxide 와 같은 free radical과 과산화수소나 lipid peroxide 등이 있는데 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하여 생체 내

고분자 세포들을 공격하여 쉽게 산화적 스트레스 환경을 조성한다<sup>2,3</sup>). 또한 불포화 지방산들과 과산화 반응에 의해 체내 과산화 지질을 축적함으로써 생체기능이 저하되어 노화 및 류마티스성 관절염, 심장병, 파킨슨병, 순환기 장애, 암 등과 같은 성인병 질환이 나타나는 것으로 보고되고 있다<sup>4,7</sup>).

동시에 free radical이 세포나 결체조직에 작용하여 해로운 물질을 생성하고 이것이 축적된 결과가 노화와 만성 퇴행성 질병의 근본적인 원인이라고 보며 또한 비만의 원인으로까지도 생각할 수 있다고 보고하고 있다<sup>8</sup>).

따라서 생체 내에 생성된 활성산소종을 제어하는 것이 성인병 질환을 예방하고 치료하는 중요한 방법 중의 하나이며, 대표적 물질 중의 하나가 항산화제이다. 대표적인 항산화제는 vitamin E, C 등과 같이 식품의 가공 또는 저장 중 발생하는 산화를 방지하기 위해 사용하는 천연 항산화제로 이들은 안전성은 우수하나 산화반응 저해 능력이 낮고 비용이 높다는 단점이 있다<sup>9</sup>). 반면 butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제는 항산화 활성은 우수하나 안전성에 대한 문제가 보고되면서 사용 범위가 제한되고 있다<sup>10-12</sup>). 이에 약용식물과 같은 천연물로부터 기존에 알려진 항산화제보다 항산화 활성이 우수하고 부작용이 없는 새로운 천연 항산화제의 탐색 연구가 지속적으로 진행되고 있다<sup>13-15</sup>).

본 연구에서는 다양한 성인병 질환에 대한 예방 및 치료 효과 향상을 위해 질환의 원인이 되는 것으로 알려진 활성산소를 제거하는 우수한 항산화 활성을 가진 물질의 개발을 검토하였다. 이에 항산화 활성을 가진 배당체 형태의 폴리페놀이 비당부 형태의 폴리페놀로 변환 시 항산화 활성이 상승한다는 보고<sup>16,17</sup>)에 착안하여 배당체 형태의 폴리페놀을 함유한 한약재를 대상으로 효소 가수분해에 의한 성분 변화와 함께 활성 변화를 탐색하였다. 성분 변화와 활성 변화를 검토하기 위해 지표성분으로서 폴리페놀 배당체인 rutin을 주성분으로 함유하고 있는 한약재인<sup>18-20</sup>) 괴화, 어성초 및 익모초에 대하여 효소 가수분해 전후의 폴리페놀 성분의 패턴과 함량 변화는 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 확인하고자 하였고, 효소 가수분해 전의 한약재와 효소 가수분해 후의 한약재 반응물의 활성 변화는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)법에 의한 항산화 활성 변화를 비교하였으므로 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 3종의 한약재인 괴화(*Sophora japonica* Linne), 어성초(*Houttuynia cordata* Thunberg) 및 익모초(*Leonurus japonicus* Houttuyn)는 천일약업사(원주, 한국)에서 구입하여 음건하고 세절하여 실험재료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 추출 및 분획

음건한 괴화, 어성초 및 익모초 50 g을 MeOH 500 ml를 가하여 수욕 상에서 3회 반복 추출하여 여과 후 농축하여 괴화(13.5 g), 어성초(10.9 g), 익모초(6.7 g)의 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물의 일부를 증류수에 현탁시킨 후 동일량의 EtOAc로 분획하여 괴화(1.5 g), 어성초(2.1 g), 익모초(0.9 g)의 EtOAc 분획물을 각각 얻었다.

#### 2) 효소 가수분해 반응

Ahn 등<sup>21</sup>)의 효소 가수분해 반응을 참조하여 각 MeOH 추출물 100 mg을 증류수 10 ml를 가하여 녹인 다음 당 가수분해 효소인 amyloglucosidase, glucosidase, pectinase, viscozyme (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 1-5%의 농도로 24-72시간 반응시킨 다음 동량의 MeOH을 첨가하여 효소 가수분해 반응을 중지시키고, 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소 가수분해 반응 분해물로 하였다.

#### 3) 성분 및 함량 변화 확인을 위한 HPLC 분석을 위한 지표 성분 표준액의 제조

효소 가수분해 반응 전후의 성분 및 함량 변화를 확인하기 위해 지표 성분으로 선정된 rutin과 quercetin 표준품 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 MeOH (J. T. Baker, Inc. Phillipsburg, NJ, USA)이나 50% MeOH에 녹여 농도를 0.5 mg/ml로 만들었다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 각각 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml가 되도록 시료를 만들고, 15초 간 vortexing한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

4) 한약재 MeOH 추출물 및 효소 가수분해물의 HPLC 용 검액 제조

효소 가수분해 반응 전후의 성분 및 함량 변화를 확인하기 위한 검체는 각각의 MeOH 추출물 및 효소 가수분해물 10 mg을 50% MeOH 1 ml로 녹이고, 15초 간 vortexing한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

5) 성분 및 함량 변화 확인을 위한 HPLC 분석 조건

효소 가수분해 반응 전후의 성분 및 함량 변화를 확인하기 위해 지표 성분인 rutin과 quercetin은 Ajiboye 등<sup>22)</sup>과 Jiao 등<sup>23)</sup>의 HPLC 분석 방법을 기초로 하여 분석 조건을 검토하여 Table 1에 제시하였다. HPLC는 Varian Prostar Workstation System (Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, CA, USA)을 칼럼은 Capcell Pak C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, 5 µm; Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였고, 칼럼 온도는 40°C, 검출기는 UV 360 nm, 이동상으로는 3차 증류수와 MeOH을 사용하여 gradient profile로 실시하였고, 유속은 1 ml/min을 사용하여 실험하였다.

Table 1. HPLC Analysis Conditions

Variables	Time (min)	Flow (ml/min)	Mobile phase	
			A (water)	B (MeOH)
1st condition	0:00	1.0	92	8
	25:00	1.0	92	8
	45:00	1.0	88	12
	60:00	1.0	76	24
	80:00	1.0	98	2
2nd condition	0:00	1.0	90	10
	20:00	1.0	90	10
	30:00	1.0	70	30
	35:00	1.0	55	45
	40:00	1.0	90	10
	50:00	1.0	90	10
Final condition	0:00	1.0	70	30
	10:00	1.0	20	80
	20:00	1.0	20	80
	25:00	1.0	50	50
	30:00	1.0	70	30

HPLC: high performance liquid chromatography.

6) 직선성(linearity)

각 지표 성분에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의하여 5개의 농도(10, 50, 100, 250, 500 µg/ml)별로 피크 면적비를 구하여 지표 성분 농도(X축)와 피크 면적비(Y축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상관계수를 구하여 확인하였다.

7) 한약재 MeOH 추출물과 효소 가수분해물에 함유된 성분 변화 및 지표 성분의 함량 변화

효소 가수분해 반응 전후의 성분 및 함량 변화를 확인하기 위해 한약재의 MeOH 추출물과 효소 가수분해물에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의해 지표 성분 표준액 및 검액을 각각 3회씩 분석한 후 성분 변화를 확인하고 검량선에 대비하여 각각의 함량을 산출하여 함량 변화를 확인하였다.

8) DPPH 라디칼 소거작용의 측정

효소 가수분해 반응 전후의 활성 변화를 확인하기 위하여 Uchiyama 등<sup>24)</sup>의 방법을 약간 변형시킨 Choi 등<sup>25)</sup>과 Yoshikawa 등<sup>26)</sup>의 DPPH (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 방법에 의해 다음과 같이 측정하였다. 0.1 M의 초산 완충액(pH 5.5, 2.0 ml)에 한약재의 MeOH 추출물, EtOAc 분획물 및 효소 가수분해물들의 용액(2.0 ml) 및 2×10<sup>-4</sup> M DPPH EtOH 용액(1.0 ml)을 가하여 전량을 5 ml로 하고 실온에 방치한 후 30분 후 UV (T60 U; PG Instruments Ltd, Wibtotf, UK) 517 nm에서의 흡광도 감소를 3회 반복하여 측정하였다. 시료 무첨가의 control의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(ug/ml)을 α-tocopherol 및 BHA와 같은 기존의 항산화제를 대조군으로 하여 시험하였다.

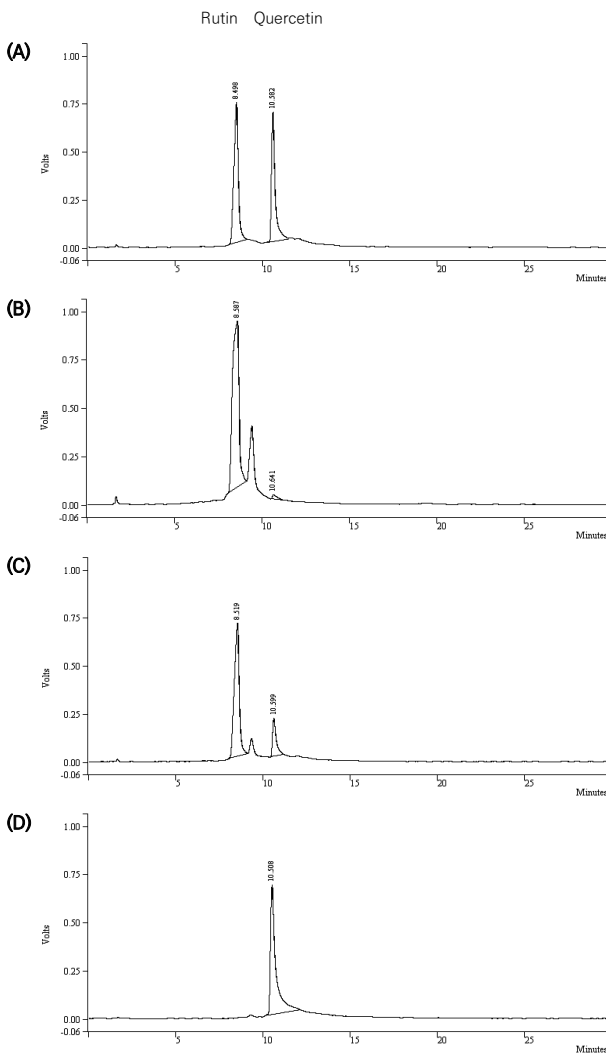
9) 통계분석

모든 분석은 3회 반복 측정하였으며, 측정값은 평균±표준편차로 나타내었다. 통계분석은 PASW Statistics 18 (IBM SPSS Statistics, IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 분산 분석한 후 Duncan의 다중검정을 실시하여 상관관계를 분석하였다.

## 결과

### 1. 성분 및 함량 변화 비교를 위한 지표 성분인 rutin과 quercetin 분석

효소 가수분해 반응 전후의 성분 및 함량 변화를 확인하기 위해 Ajiboye 등<sup>22)</sup>과 Jiao 등<sup>23)</sup>의 HPLC 분석 방법을 참조하여 선행 실험한 후 재검토하여 확립된 HPLC 분석 방법(Table 1)을 사용하여 지표 성분들의 혼합물과 한약재의 MeOH 추출물 및 효소 가수분해 반응물의 HPLC chromatogram의 결과를 Figs. 1-3에 나타내었다. Fig. 1에

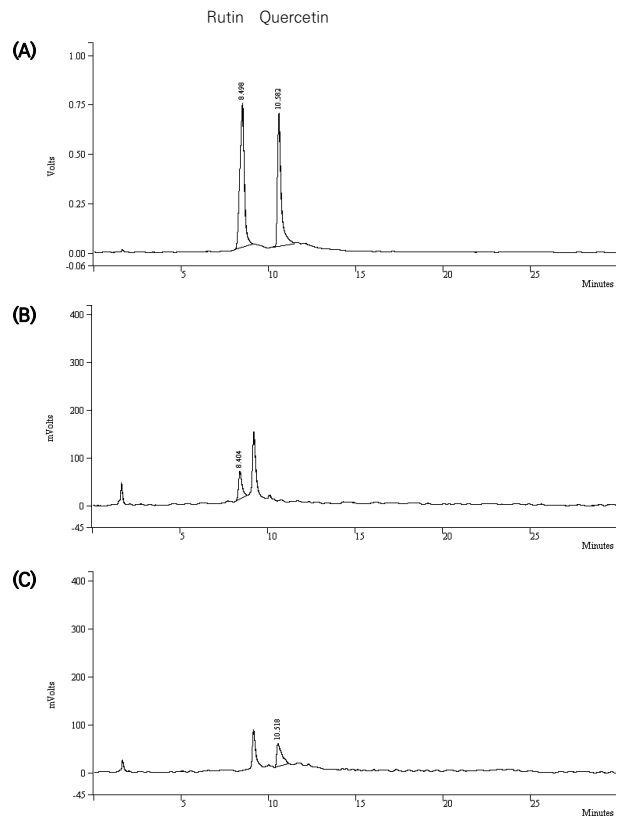


**Fig. 1.** (A) HPLC chromatogram of rutin and quercetin, (B) HPLC chromatography of MeOH extract of *Sophora japonica* Linne, (C) HPLC chromatogram of viscoszyme (2.5%, 24 hr) reaction product of *Sophora japonica* Linne, (D) HPLC chromatogram of viscoszyme (5%, 72 hr) reaction product of *Sophora japonica* Linne. HPLC: high performance liquid chromatography.

서 지표 성분의 혼합물인 (A) 차트에서 retention time (RT) 8.49분에서는 rutin의 피크를 10.58분에서는 quercetin의 피크가 확인되었다. 이는 분석법 확립을 위해 참고한 기존의 HPLC 분석법과 비교하였을 때 본 실험에서는 신속한 분석을 위해 전체 분석 시간을 단축했기 때문이라고 생각한다. 또한 Fig. 1에서 차트 (B)의 괴화의 MeOH 추출물에서는 지표 성분이 검출된 것과 같은 시간대에 rutin과 quercetin 피크가 나타나고, Fig. 2에서 차트 (B)의 어성초의 MeOH 추출물에서는 rutin의 피크가 그리고 Fig. 3의 차트 (B)의 익모초 MeOH 추출물에서도 지표 성분과 같은 시간대에 rutin과 quercetin 피크가 보여짐에 따라 괴화와 어성초 그리고 익모초는 지표 성분으로 선정된 flavonoid 배당체인 rutin임을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

### 2. 지표 성분의 직선성 검토

효소 가수분해 반응 전후의 성분 변화 확인 후 함량의



**Fig. 2.** (A) HPLC chromatogram of rutin and quercetin, (B) HPLC chromatography of MeOH extract of *Houttuynia cordata* Thunberg, (C) HPLC chromatogram of viscoszyme (1%, 24 hr) reaction product of *Houttuynia cordata* Thunberg. HPLC: high performance liquid chromatography.

변화를 확인하기 위하여 각 지표 성분의 표준액에 대하여 5개의 농도(10, 50, 100, 250, 500 µg/ml)로 검량선을 작성한 후 검량선으로부터 구한 직선성의 상관계수를 Table 2에 나타내었다. 상관계수 값이 모두 0.991 이상으로서 직선성이 인정되었다.

### 3. 효소 가수분해 조건의 확립

한약재 3종에 대하여 성분 및 함량 변화 그리고 활성 변화를 유도하기 위하여 한약재의 MeOH 추출물에 대하여 다양한 당 가수분해 효소 즉 amyloglucosidase, glucosi-

dase, pectinase 및 viscozyme을 사용하여 이미 보고된 당 분해 관련 논문<sup>21,27)</sup> 기초로 당 개별 반응을 검토한 결과 Fig. 1에 나타난 것과 같이 rutin의 함량이 비교적 높은 괴화는 viscozyme의 농도를 5%로 하여 72시간 효소 분해 반응하였을 때 배당체류가 완전히 당 가수분해가 일어났음을 알 수 있었다. 어성초와 익모초는 Fig. 2와 Fig. 3에서와 같이 viscozyme 1% 농도로 24시간에서 피크 변화가 크게 일어나지 않는 어성초의 미지의 물질을 제외하고는 배당체류가 완전 가수분해되었음을 확인하였다. Viscozyme 이외의 당 가수분해 효소들은 thin layer chromatography (TLC) 등을 이용하여 반응 과정을 확인한 결과, 반응이 진행이 안 되던지 혹은 분해 속도가 현저히 느려 최종 당 가수분해 조건은 기보고된 조건<sup>27)</sup>과 유사하게 pH 5.0에서 37°C의 조건에서 효소는 viscozyme으로 확립하였다.

### 4. 효소 가수분해 반응 전후의 성분 패턴 변화 및 지표 성분의 함량 변화

Fig. 1에서와 같이 효소 가수분해 반응 전후 괴화의 성분 패턴 변화는 지표 성분인 배당체 rutin의 피크가 점차 감소하고 비당부인 quercetin의 피크가 점차 증가하는 변화를 보이고 있고 미지의 배당체 피크도 감소되고 있음을 보였다. Fig. 2에서 나타난 것과 같이 어성초의 효소 가수분해 반응 전후의 성분 패턴 변화는 피크 변화가 크게 일어나지 않는 미지의 물질을 제외하고는 지표 성분인 배당체 rutin이 감소하고 비당부인 quercetin의 피크가 점차 증가하는 변화를 보였다. 또한 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 익모초의 효소 가수분해 반응 전후의 성분 패턴 변화는 지표 성분인 배당체 rutin과 미지의 배당체 피크가 점차 감소하고 비당부인 quercetin의 피크가 점차 증가하는 변화를 보였다.

한편 지표 성분으로 선정된 배당체와 비당부의 함량 변화는 Table 2에 제시한 검량선을 사용하여 3종 한약재의 MeOH 추출물과 효소 가수분해 반응물에 함유된 지표 성분의 함량을 각각 산출하여 Table 3에 나타내었다. Table 3에서와 같이 괴화의 효소 가수분해 전의 MeOH 추출물은 rutin 49.32 mg/g, quercetin 1.26 mg/g이고, 어성초의 효소 가수분해 전 MeOH 추출물은 rutin 0.87 mg/g, quercetin은 거의 측정되지 않았고, 익모초의 효소 가수분해 전 MeOH 추출물은 rutin 1.21 mg/g, quercetin 0.43 mg/g의 함유량을 보였다. 효소 가수분해 후의 각 한약재별 지

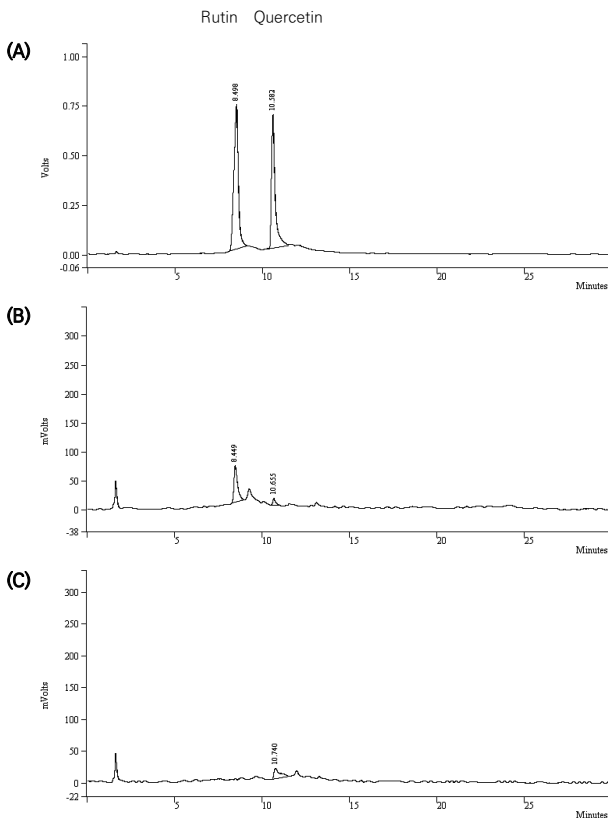


Fig. 3. (A) HPLC chromatogram of rutin and quercetin, (B) HPLC chromatography of MeOH extract of *Leonurus japonicus* Houttuyn, (C) HPLC chromatogram of viscozyme (1%, 24 hr) reaction product of *Leonurus japonicus* Houttuyn. HPLC: high performance liquid chromatography.

Table 2. Calibration Curve Equations and R<sup>2</sup> Values of Rutin and Quercetin

Sample	Equation	R <sup>2</sup>
Rutin	y = 12571x - 342499	0.9922
Quercetin	y = 21380x - 603666	0.9918

표 성분의 함량 변화는 괴화는 viscozyme의 농도 증가 및 반응 시간의 증가에 따라 Table 3에 제시한 것과 같이 rutin의 함량은 감소하고 quercetin의 함량은 증가하였다. 최종 확립된 조건인 viscozyme의 농도를 5%로 하고 72시간 효소 가수분해를 한 결과 rutin과 미지의 배당체는 확인되지 않고 비당부인 quercetin의 농도가 29.66 mg/g로 증가되었음을 확인하였다. 한편 어성초와 익모초는 viscozyme의 농도를 1%로 하고 24시간 효소 가수분해를 한 결과 어성초의 효소 가수분해 반응물에서는 rutin은 거의 관측되지 않고 미지 물질은 크게 변화하지 않는 경향을 보였고 비당부인 quercetin이 0.66 mg/g로 측정되었다. 익모초의 효소 가수분해 반응물에서는 rutin과 미지의 배당체는 측정되지 않고 미지의 비당부 피크와 지표 성분인 quercetin이 0.71 mg/g의 함량을 나타내었다.

이상의 결과 효소 가수분해에 의해 배당체인 rutin과

미지의 배당체들의 당이 개열되어 비당부인 quercetin이나 다른 비당부류로 전환되어졌음을 확인할 수 있었다.

## 5. 효소 가수분해 반응 전후의 DPPH 라디칼 소거작용에 의한 활성 변화

효소 가수분해에 따른 항산화 활성 변화를 확인하기 위하여 효소 가수분해 전후의 3종 한약재 시료들의 DPPH radical 소거 활성 변화를 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 배당체류의 함량이 높은 괴화는 효소 가수분해 반응 전의 MeOH 추출물의 50% 억제 농도는 5.0 ug/ml로 대조군인 합성 항산화제인 BHA보다는 약하나 천연 항산화제인 토코페롤과는 유사한 항산화 활성을 보였다. 비당부류의 함량이 낮은 EtOAc 분획물은 9.1 ug/ml의 50% 억제 농도를 보여 대조군보다는 약한 항산화 활성을 나타내었다. 반면 효소 가수분해 반응 전의 어성초와 익모초의

**Table 3.** The Change in Content of Rutin and Quercetin by Enzymatic Hydrolysis

Compound	Rutin (mg/g)		Quercetin (mg/g)	
	Before enzymatic hydrolysis	After enzymatic hydrolysis	Before enzymatic hydrolysis	After enzymatic hydrolysis
<i>Sophora japonica</i> Linne (2.5%, 24 hr)*	49.32	40.73	1.26	7.82
<i>Sophora japonica</i> Linne (5%, 24 hr)	49.32	26.10	1.26	11.26
<i>Sophora japonica</i> Linne (5%, 72 hr)	49.32	N.D	1.26	29.66
<i>Houttuynia cordata</i> Thunberg (1%, 24 hr)	0.87	N.D	N.D	0.66
<i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn (1%, 24 hr)	1.21	N.D	0.43	0.71

N.D: no detection.

\*Concentration of viscozyme and reaction time (hour).

**Table 4.** The Change of Radical Scavenging Activity by Enzymatic Hydrolysis

Samples	IC <sub>50</sub> (ug/ml)*	
$\alpha$ -tocopherol	4.4±0.2	
BHA	3.1±.1	
	Before enzymatic hydrolysis	After enzymatic hydrolysis <sup>†</sup>
MeOH ext. of <i>Sophora japonica</i> Linne	5.0±0.3	3.0±0.2
EtOAc Fr. of <i>Sophora japonica</i> Linne	9.1±0.5	
MeOH ext. of <i>Houttuynia cordata</i> Thunberg	15.6±1.1	11.2±0.7
EtOAc Fr. of <i>Houttuynia cordata</i> Thunberg	13.6±0.9	
MeOH ext. of <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn	14.4±0.9	10.2±0.5
EtOAc Fr. of <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn	12.6±0.7	

Data are expressed as means±standard deviation of triplicate experiments.

BHA: butylated hydroxyanisole, ext.: extract, Fr.: fraction.

\*Amount required for 50% reduction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ( $2 \times 10^{-4}$ , 0.079 mg) solution, <sup>†</sup>50% inhibitory concentration after enzymatic hydrolysis of MeOH ext.

MeOH 추출물은 15.6 ug/ml과 14.4 ug/ml, EtOAc 분획물은 13.6 ug/ml과 12.6 ug/ml의 50% 억제 농도로 대조군인 BHA와 토코페롤보다 낮은 항산화 활성을 보이는데 이는 낮은 함량의 배당체류와 비당부류에 의한 것으로 생각된다.

효소 가수분해 후의 3종 한약재 효소 가수분해 반응물의 항산화 활성 변화는 괴화는 효소 가수분해 반응물의 50% 억제 농도가 3.0 ug/ml로서 대조군인 BHA와 유사한 우수한 항산화 활성을 나타내는 변화를 보였다. 이에 비해 어성초와 익모초의 50% 억제 농도는 배당체류의 당분해에 의해 비당부류로의 변화에 의해 11.2 ug/ml과 10.2 ug/ml로서 효소 가수분해 반응 전의 MeOH 추출물과 EtOAc 분획물에 비해 항산화 활성이 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 배당체 화합물과 비교하여 비당부류 화합물의 항산화 활성이 약간 우수하다는 논문<sup>16,17)</sup>과 유사한 결과를 보이고 있다.

## 고찰 및 결론

본 연구는 효소 가수분해에 따른 한약재의 성분과 활성 변화에 대한 연구로서 배당체류를 함유하며 항당뇨 활성<sup>28)</sup>과 산화적 DNA 손상 억제 활성이 알려져 있는<sup>29)</sup> 괴화와 내피 nitric oxide 생성의 조절을 통해 지구력 개선 효과와<sup>30)</sup> 항바이러스 활성이 알려진<sup>31)</sup> 어성초 및 항염증 활성과<sup>32)</sup> 혈관신생 효과가 보고된<sup>33)</sup> 익모초의 MeOH 추출물에 대하여 당 가수분해 효소 처리 후에 배당체류와 비당부류 성분의 패턴 변화 및 함량 변화와 함께 항산화 활성 변화를 비교하였다.

당 가수분해에 사용된 효소는 amyloglucosidase, glucosidase, pectinase 및 viscozyme과 같이 잘 알려진 당 분해 효소에 대하여 효소 가수분해 반응을 검토한 결과 viscozyme이 3종 한약재 MeOH 추출물에 대하여 효소 가수분해 반응이 원활히 진행되었고, 배당체의 함유량에 따라 viscozyme의 농도는 1-5%, 반응 시간은 24-72시간, pH는 5.0, 온도는 37°C의 조건으로 효소 가수분해 반응 조건을 확립하였다.

효소 가수분해 반응 결과 배당체류와 비당부류 성분들의 패턴 변화는 미지의 배당체류와 지표 성분으로 선정된 배당체인 rutin의 함유량이 비교적 높은 괴화는 viscozyme 2.5% 농도에서 24시간 반응에서는 미지의 배당체류와 ru-

tin이 완전 가수분해되지 않았다. 이에 viscozyme의 농도를 5%로 하고 72시간 반응에서는 미지의 배당체류와 rutin이 완전 가수분해되는 성분 변화를 보였고, 함량 변화에서는 지표 성분 배당체인 rutin의 함량이 감소하고 비당부류의 지표 성분으로 선정된 quercetin의 함량이 증가되었다. 한편 미지의 배당체류와 지표 성분으로 선정된 배당체인 rutin의 함량이 비교적 소량인 어성초와 익모초는 viscozyme의 농도가 1%에서 24시간만에 어성초의 미지의 물질 이외는 배당체류가 완전 가수분해되어 비당부류로 성분 변화가 발생하는 것으로 확인되었고, 함량 변화에서는 지표 성분 배당체인 rutin의 함량이 감소하고 비당부류의 지표 성분으로 선정된 quercetin 함량이 소량 증가하는 것으로 확인되었다.

효소 가수분해에 따른 활성 변화는 항산화 실험 결과 비당부류의 함량이 증가하는 변화를 보인 괴화는 효소 가수분해 후의 반응물은 대조군 BHA와 유사한 우수한 항산화 활성 변화를 나타내었다. 이에 비해 비당부류가 소량 증가하는 변화를 나타낸 어성초와 익모초는 항산화 활성이 약간 증가하는 경향을 보였다.

이상의 실험 결과를 종합하면 효소를 이용한 3종 한약재의 당 가수분해 반응에서 효소의 농도와 반응 시간에 따른 한약재별 배당체류가 비당부류로 전환되는 성분 패턴 변화와 함께 함량의 변화도 확인할 수 있었으며, 성분 변화에 따른 항산화 활성의 변화는 폴리페놀류의 배당체류 함량이 적은 어성초와 익모초는 항산화 활성 변화가 미약했지만 폴리페놀계 배당체를 다량으로 함유하는 한약재인 괴화의 항산화 효과 변화는 효소 가수분해 후의 반응물이 천연 항산화제 대조군인 토코페롤보다는 우수하고 합성 대조군 BHA와 유사한 우수한 항산화 효과를 보이는 변화를 나타냄으로서 향후 폴리페놀계 배당체를 다량으로 함유한 한약재에도 효소 가수분해 반응을 활용한다면 우수한 항산화 효과를 나타내는 가공 한약재의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 상지대학교 2019년 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur NM, Verneulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol & Med.* 1999 ; 26(1-2) : 202-26.
- Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem.* 1997 ; 174(1-2) : 305-19.
- Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2017 ; 38(7) : 592-607.
- Phull AR, Nasir B, Haq I, Kim SJ. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chem Biol Interact.* 2018 ; 281 : 121-36.
- Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019 ; 132 : 73-82.
- Ceratti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* 1994 ; 344(8926) : 862-3.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radical, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984 ; 1(8391) : 1396-7.
- Cha YY. Experimental study on effects of *Cucurbita moschata* Duch. on antioxidation. *J Korean Med Obes Res.* 2009 ; 9(2) : 57-63.
- Lee YS, Joo EY, Kim NW. Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. *Korean J Food Preserv.* 2005 ; 12(1) : 75-9.
- Umemura T, Kodama Y, Hioki K, Inoue T, Nomura T, Kurokawa Y. Butylhydroxytoluene (BHT) increases susceptibility of transgenic rash2 mice to lung carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001 ; 127(10) : 583-90.
- Conning DM, Phillips JC. Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food Chem Toxicol.* 1986 ; 24(10-11) : 1145-8.
- Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Natl Cancer Inst.* 1983 ; 70(2) : 343-52.
- Shi D, Yang J, Jiang Y, Wen L, Wang Z, Yang B. The antioxidant activity and neuroprotective mechanism of isoliquiritigenin. *Free Radic Biol Med.* 2020 ; 152 : 207-15.
- Ahmadi SM, Farhoosh R, Sharif A, Rezaie M. Structure-antioxidant activity relationships of luteolin and catechin. *J Food Sci.* 2020 ; 85(2) : 298-305.
- Lahmadi S, Belhamra M, Karoune S, Imad K, Bensouici C, Kechebar MSA, et al. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Euphorbia retusa* Forssk. *Nat Prod Res.* 2020 ; 34(24) : 3545-7.
- Cai YJ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci.* 2006 ; 78(25) : 2872-88.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002 ; 13(10) : 572-84.
- Park SJ, Shin EH, Hahm TS. Biological activities in the extract of Flos *Sophora japonica* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009 ; 38(1) : 9-13.
- Yang ZN, Sun YM, Luo SQ, Chen JW, Chen JW, Yu ZW, et al. Quality evaluation of *Houttuynia cordata* Thunb. by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection (HPLC-DAD). *Pak J Pharm Sci.* 2014 ; 27(2) : 223-31.
- Lee SW, Kim GE, Chung SH, Kim SG, Kim DH, Kim JH, et al. Study on the seasonal and regional variation of rutin content of Leonuri Herba. *Yakhak Hoeji.* 2007 ; 51(3) : 157-63.
- Ahn SC, Kim MS, Lee SY, Kang JH, Kim BH, Oh WK, et al. Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean Citrus peel by carbohydrate hydrolysing enzyme. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 2005 ; 33(4) : 288-94.
- Ajiboye BO, Ojo OA, Okesola MA, Akinyemi AJ, Talabi JY, Idowu OT, et al. In vitro antioxidant activities and inhibitory effects of phenolic extract of *Senecio bialfrae* (Oliv and Hiern) against key enzymes linked with type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Food Sci Nutr.* 2018 ; 6(7) : 1803-10.
- Jiao Y, Kilmartin PA, Fan M, Quek SY. Assessment of phenolic contributors to antioxidant activity of new kiwifruit cultivars using cyclic voltammetry combined with



- HPLC. Food Chem. 2018 ; 268 : 77-85.
24. Uchiyama M, Suzuki Y, Fukuzawa K. Biochemical studies of physiological function of tocopheronolactone. Yakugaku Zasshi. 1968 ; 88(6) : 678-83.
  25. Choi JS, Park JH, Kim HG. Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. Kor J Pharmacogn. 1993 ; 24(4) : 299-303.
  26. Yoshikawa M, Harada E, Miki A, Tsukamoto K, Ling SQ, Yamahara J, et al. Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in vietnam. Yakugaku Zasshi. 1994 ; 114(2) : 129-33.
  27. Park EB, Kim HS, Shin SY, Ji IA, Kim JH, Kim SG, et al. Antioxidative activity of *Cornus officinalis* extracts obtained by four different extraction techniques. J Life Sci. 2012 ; 22(11) : 1507-14.
  28. Wang T, Miao M, Bai M, Li Y, Li M, Li C, et al. Effect of *Sophora japonica* total flavonoids on pancreas, kidney tissue morphology of streptozotocin-induced diabetic mice model. Saudi J Biol Sci. 2017 ; 24(3) : 741-7.
  29. Jang TW, Kim YR, Lee SH, Kim DW, Park JH. Antioxidative activities and inhibition of DNA damage of ethylacetate fraction from Sophorae Flos and Sophorae Fructus. Kor J Herbology. 2015 ; 30(2) : 31-6.
  30. Yang UJ, Maeng H, Park TS, Shim SM. *Houttuynia cordata* extract improves physical endurance performance by regulating endothelial production of nitric oxide. J Med Food. 2015 ; 18(9) : 1022-31.
  31. Chiow KH, Phoon MC, Putti T, Tan BK, Chow VT. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinannserin on murine coronavirus and dengue virus infection. Asian Pac J Trop Med. 2016 ; 9(1) : 1-7.
  32. Hu YM, Liu WJ, Li MX, Li HB, Jiang T, Cheng NB, et al. Two new labdane diterpenoids feom aerial parts of *Leonurus japonicus* and their anti-inflammatory activity. Nat Prod Res. 2019 ; 33(17) : 2490-7.
  33. He Y, Shi JY, Peng C, Hu LJ, Liu J, Zhou QM, et al. Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos. Fitoterapia. 2018 ; 128 : 36-42.