Inhibitory activities on biological enzymes of extracts from *Oplismenus undulatifolius*

Eun-ho Lee¹ · Byung-Oh Kim¹ · Young-Je Cho¹

주름조개풀(*Oplismenus undulatifolius*) 추출물의 생리활성 효소 억제 효과

이은호¹ · 김병오¹ · 조영제¹

Received: 10 January 2017 / Accepted: 17 February 2017 / Published Online: 30 June 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract The phenolic contents which were extracted with water and 70% ethanol from *O. undulatifolius* were 7.7, 10.1 mg/g, respectively. The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging activity of water and ethanol extracts were 78, 82% at 50 µg/mL phenolics, respectively. The 2,2'-Azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization activity were 92, 76% at 100 µg/mL phenolics. Antioxidant protection factor in water and ethanol extracts at 200 µg/mL phenolics were 1.51 and 2.08 PF, respectively. Thiobarbituric acid reactive substance were 84% in water extracts and 99% in ethanol extracts at 50 µg/mL phenolics, respectively. The inhibition activity on α -Glucosidase was 44% in ethanol extracts at 200 µg/mL phenolics. The inhibition activity on α -amylase was 37-88% in water extracts at 50-200 µg/mL phenolics. The tyrosinase inhibition activity as whitening effect were 82% in ethanol extracts. The elastase inhibition activity were 4, 61% in water and ethanol extracts, respectively. The collagenase inhibition activity of anti-wrinkle effect showed an excellent wrinkle improvement effect as 39% in water extracts and 67% in ethanol extracts at 200 µg/mL phenolics, respectively. The hyaluronidase inhibition activity as anti-inflammation effect of ethanol extracts was confirmed to 46%

of inhibition at 200 µg/mL phenolic. The astringent effect of water and ethanol extracts was confirmed to 13, 32% of effect at 200 µg/mL phenolic, respectively.

Keywords Antioxidant · Biological activity · Extracts · *Oplismenus undulatifolius*

서론

1992년에 개최되었던 UN 회의에서 ‘생물다양성협약 선언문’이 체결되면서 식물자원의 배타적 권리가 인정되어 국가 간 식물 유전자원을 탐색하여 확보하는 등 산업화 경쟁이 심화되고 있으며, “세계 각종 국제협약단체에서는 식물자원의 개발 및 이용에 대한 상업적 권리를 제도화 하고 있다”라고 발표하였다 (KFSV 2009). 이러한 국제적인 변화와 추세에 따라 우리나라 산림자원 식물에 대한 국가적인 지원과 적극적인 개발 및 이용의 중요성이 강조 되어지고 있는 현실이다. 또한 우리나라는 급격한 경제성장으로 인해서 서구화된 식생활과 같은 생활양식에 의해 비만, 당뇨병, 고혈압, 동맥경화 등과 같은 활성산소로 인한 만성질환이나 주름, 검은색, 기미, 피부염증 등의 피부질환이 만연하게 되었다. 이와 같은 심혈관 또는 피부 질환은 고콜레스테롤증과 고중성지방혈증, 음주, 흡연, 운동부족, 스트레스 등과 같은 요인들로 인하여 생체 내 산화적 손상이 촉진되고 그로 인해서 항산화 영양소나 효소의 활성도가 낮아지게 된다 (Posner 등, 2000).

활성산소종(Reactive oxygen species)은 생체 내에서 유기호흡을 하는 과정에서 발생하며, free radical을 가져 불안정하며 그로 인한 강한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 강한 활성 때문에 세포 내 독성을 나타내기도 하며 여러 퇴행

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

¹School of Food science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, 80 University Street, Bukgu, Daegu, 41566, 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.

성질환이나 암, 노화와 같은 만성질환과 피부질환에 강한 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구에서는 활성산소종이 낮은 농도에서는 세포 내 신호전달과정에서 2차 신호전달물질(second messenger)로서 작용하는 것이 밝혀졌으며, 암세포에서 apoptosis를 유발하거나 cell cycle arrest를 일으켜 암세포의 증식을 억제할 수 있다는 것이 밝혀지고 있다. 이러한 양면성 때문에 활성산소종의 생성과 분해에 관련한 메커니즘에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(An 2015).

생리활성 효과를 지닌 물질은 동식물에 널리 분포하고 있으며, 식물체는 자외선에 의한 산화나 자동산화, 곤충들로 인한 피해로부터 자신을 보호하기 위하여 폴리페놀류의 항산화 물질을 세포 내 함유하며, 플라보노이드류와 산성의 페놀화합물은 항산화, 항알러지, 항당뇨, 항암성, 항염증, 미백, 주름개선 등 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 있다(Rice-Evans 등, 1996). 최근에는 효능이 검증된 약용식물자원 유래의 생리활성과 우수한 기능성 물질에 대한 기능성식품 및 기능성 화장품 분야에서 많은 연구와 개발이 이루어지고 있으며(Kinsella 등, 1993), 약용식물이나 산채류, 한약재 등 약용부위의 물질을 탐색하여 건강기능성 식품이나 식품 부재료로 개발하는 것은 천연자원의 효율적인 이용 측면과 새로운 식품자원 개발, 신소재 개발에 기여할 수 있다는 측면에서도 매우 의미 있는 일이라 할 수 있다(Lee 등, 2010).

주름조개풀(*Oplismenus undulatifolius*)은 명들대 또는 털주름풀이라 불리는 벼과(Gramineae)의 다년생 초본으로 산야의 숲속에서 지천으로 퍼져서 자라며, 우리나라에서는 중부 이남에 자생하며 세계적으로 지중해 연안에서 중앙 아시아, 인도 북부를 거쳐 극동에 널리 분포한다(Lee 1999). 주름조개풀은 가축의 사료로 이용되고 있으며 약용으로는 밝혀진 바가 없고, 현재까지 *Oplismenus* 속에 대한 식물화학적 성분 연구에서 triterpenoid 성분인 isoorborinol, cylindrin, triedelin이 보고된 것이 전부이다(Ohmoto과 Ikuse 1970).

이와 같이 주름조개풀에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았음에 착안하여 주름조개풀의 생리활성에 대한 기능성을 측정하여 기능성 식품 및 미용식품 분야에 고부가가치의 기능성 신소재로서의 개발가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 주름조개풀은 실험을 위해 대구 팔공산 인근에서 직접 채취하여 이물질을 제거한 후 45°C dry oven(FO600M, Jeitech, Daejeon, Korea)에서 건조시킨 후 40 mesh로 분쇄하여 시료로 사용하였다.

주름조개풀 추출물의 제조

생리활성 측정을 위한 추출물의 제조는 water 추출물의 경우 주름조개풀 분말 1g을 증류수 200 mL에 침지하여 추출물이 100 mL가 될 때까지 가열한 후 냉각하여 24시간 동안 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 예비실험에서 추출 수율이 가장 높았던 70% ethanol을 사용하여, 주름조개풀 분말 1g에 70% ethanol 100 mL를 첨가하여 24시간 동안 shaking incubator에서

교반 추출하였다. 각 추출물은 Whatman No. 1 filter paper(Whatman inc., piscataway, New jersey, USA)로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator(Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

Total phenolic contents 정량

Total phenolic 정량은 추출물 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 잘 섞어 5분간 방치한 후 Na_2CO_3 1 mL를 가하여 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다(Folin과 Denis 1912).

항산화 효과 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법(1958)에 준하여 측정하였으며, 전자공여능(%)은 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다. 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization (ABTS)의 측정은 Fellegrini 등의 방법(1999)에 준하여 측정하였고, 저해율(%)은 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다. Antioxidant protection factor (PF)는 Andarwulan과 Shetty의 방법(1999)에 준하여 측정하였으며, PF는 반응구의 흡광도/대조구의 비로 나타내었다. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARs)측정은 Buege와 Aust의 방법(1978)에 준하여 측정하여 저해율(%)은 1-(반응구의 TBARs μM /대조구의 TBARs μM)×100으로 나타내었다.

α -Glucosidase, α -amylase 저해효과 측정

α -Glucosidase 저해효과 측정은 Tibbot과 Skadsen의 방법(1996)에 준하여 측정하였다. 50 mM sodium succinate buffer (pH 6.8)에 p-nitrophenol- α -D-glucopyranoside를 용해시켜 1 mg/mL 농도의 기질 2 mL와 효소액 0.1 mL를 혼합하여 반응구에는 시료 0.1 mL, 대조구에는 증류수 0.1 mL를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응종료시약 5% Na_2CO_3 를 첨가하였다. 이때 생성된 p-nitrophenol을 흡광도 470 nm에서 OD값을 측정한 후 표준곡선에 대입하여 양을 환산하고, 저해율(%)은 (1-시료의 p-nitrophenol 함량/대조구의 p-nitrophenol 함량)×100으로 계산하였다. Pancreatin α -amylase 저해효과 측정은 agar diffusion 방법(Davidson과 Parish 1989)에 준하여 측정하였으며, plate는 agar 5 g과 soluble starch 5 g을 증류수에 녹여 끓인 후, 121°C로 15분간 멸균하고 15 mL씩 petridish에 붓고 굳혀 사용하였다. 제작한 plate에 지름 10 mm disc paper를 올린 후 시료액 0.8 mL와 효소액 0.2 mL (1,000 U/mL)를 혼합해 disc paper에 각각 분주하고 대조구에는 시료액 대신 증류수를 넣어 37°C에서 3일간 배양한 후 I_2/KI (5 mM I_2 in 3% KI) 3 mL를 가하여 15분간 발색시킨 후 저해율(%)은 (1-시료의 Area/대조구의 Area)×100으로 계산하였다.

Tyrosinase 저해효과 측정

Tyrosinase 저해효과 측정은 Vincent와 Hearing의 방법(1987)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 2.3 mL와 1.5 mM L-tyrosine 기질 0.4 mL, mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich Co, Louis, MO, USA, 250 U/mL)

0.1 mL와 시료 0.2 mL를 넣고, 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.2 mL를 첨가하고 37 °C에서 20분간 반응시켜 흡광도 475 nm에서 측정하였다.

Elastase, collagenase 저해효과 측정

Elastase 저해효과 측정은 Kraunsoe 등의 방법(1996)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1 mL에 0.8 mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 기질 0.1 mL, 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase (Sigma-Aldrich Co.) 효소 0.1 mL와 시료 0.1 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 37 °C에서 20분간 반응시켜 p-nitroaniline 생성량을 흡광도 410 nm에서 측정하였다. Collagenase 저해효과 측정은 Wunsch와 Heidrich의 방법(1963)에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질 0.25 mL 및 시료 0.1 mL의 혼합액에 0.2 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하였으며, 대조구에는 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 2 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance)×100으로 계산하였다.

Astringent effect 측정

Astringent 활성은 Lee 등의 방법(2002)에 준하여 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질(hemoglobin)을 사용하여, 원심분리 용기에 각각의 시료와 헤모글로빈 용액을 1:1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 2,000 rpm에서 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수를 넣어 반응시켰다. 저해율(%)은 (1-시료의 투과율/대조구의 투과율)×100으로 계산하였다.

Hyaluronidase (HAase) 저해 효과 측정

HAase 저해활성은 Dorfman와 OTT의 방법(1948)에 준하여 측정하였다. 반응구는 시료 0.5 mL에 20 mM Sodium phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 HAase (1,000 U/mL) 0.5 mL를 혼합하여 38 °C에서 5분간 반응시키고 0.3 M phosphate buffer (pH 5.3)에 녹인 기질(4 mg/mL) 0.5 mL를 넣어 다시 38 °C에서 45 분간 반응시킨 후 0.04 M acetate buffer (pH 3.75)에 녹인 알부민용액 5 mL를 첨가한 후 5분간 방치하고 600 nm에서 투과율을 측정하였다. 대조구는 시료 대신 증류수 0.5 mL를 넣어 반응시켰다. 저해율(%)은 (1-시료의 투과율/대조구의 투과율)×100으로 계산하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였고 자료의 통계처리는 SPSS 23 for windows (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균±표준편차(mean±standard deviation)로 표시하였고 분산분석 Duncan's multiple range test one-way ANOVA를 실시하여 시료간의 유의차를 $p < 0.05$ 수준으로 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

Total phenolic contents의 최적추출 조건

천연식물기원의 항산화 활성 및 생리활성을 가지는 물질은 식물의 잎, 꽃, 열매, 줄기, 뿌리 및 껍질 등에 존재하는데, 특히 식물체는 자외선에 의한 산화나 자연산화, 그리고 곤충과 해충 등으로부터 자신을 보호하기 위하여 폴리페놀류의 항산화 물질을 생성하여 세포내에 함유하며 다양한 생리활성을 지닌 것으로 알려져 있다. 특히 천연물 중 생약재를 포함한 산채류, herb류가 가장 많이 연구되고 있다(Rhee 등, 1990). 따라서 주름조개로부터 생리활성에 관여하는 phenolic 화합물을 추출하기 위하여 다양한 추출용매와 농도에 따른 phenolic 화합물의 용출량을 알아보았다. 그 결과 water, ethanol로 추출하였을 때 Fig. 1A에서와 같이 7.70, 5.84 mg/g의 함량으로 다른 유기용매를 사용하여 추출한 것에 비해 상대적으로 높은 phenolic 화합물의 용출량을 확인하였다. Water 추출물과 유기용매 중 추출 수율이 가장 높았던 ethanol을 다양한 농도로 이용하여 phenolic 함량을 측정한 결과 Fig. 1B에서와 같이 70% ethanol 추출물에서 10.14 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 주름조개풀 추출물의 phenolic 함량이 생리활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 고형분의 phenolic 함량을 측정한 결과 Fig. 1C에서와 같이 주름조개풀 water, ethanol 추출물의 고형분 50 µg 당 각각 1.26, 1.68 µg/g의 함량을 나타내었다. 고형분과 phenolic 성분의 생리활성 효능을 비교를 위해 DPPH radical을 측정한 결과 Fig. 1D에서와 같이 주름조개풀 water, ethanol 추출물의 고형분 50 µg/mL 농도에서 각각 2.8, 8.3%의 전자공여능을 나타내어 50 µg/mL phenolic 농도에서 각각 73.9, 81.4%의 전자공여능을 나타낸 것에 비해 상대적으로 매우 낮은 활성을 나타내었다. 위의 결과에 따라 생리활성에 대한 기능성 탐색을 위하여 주름조개풀을 water, 70% ethanol을 이용하여 추출한 후 phenolic 농도를 조절하여 생리활성 효과를 검증하였다.

주름조개풀 추출물의 항산화 효과

DPPH radical 소거능은 항산화 물질의 전자공여능으로 인해 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색에서 색이 탈색되는 정도를 나타내는 지표로 항산화 효과를 나타내는 척도가 된다고 알려져 있다(Ahn 2005). 주름조개풀 추출물을 이용하여 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 2A에서와 같이 50-200 µg/mL phenolic 농도에서 water, ethanol 추출물 각각 78-85, 82-100%의 높은 전자공여능을 나타내었다. 이 결과는 Jeon 등(2012)이 굴담초 추출물로 전자공여능을 측정한 결과 200 µg/mL phenolic 농도에서 ethanol 추출물이 90%의 전자공여능을 나타내었다고 보고한 것보다 주름조개풀 추출물의 전자공여능이 더 우수한 것으로 판단되었다. ABTS radical 소거활성은 수소공여 항산화제(hydrogendonating antioxidants)와 연쇄절단형 항산화제(chainbreaking antioxidants)를 측정할 수 있고, 수용상(aqueous phase)과 유기상(organic phase)모두에 적용할 수 있는 측정 방법이다(Re 등, 1999). Potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS+가 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 색이 탈색되는 것을 이용한 항산화능 측정 방법으로 DPPH radical 소거능 측정은 free radical을 소거하는 반면, ABTS는

Fig. 1 The content of phenolic in extracts on various solvents (A), ethanol concentration (B), and in 50 μ g concentration of solid (C), DPPH activity (D) in 50 μ g concentration of solid and phenolic from *O. undulatifolius*. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

양이온 radical을 제거하는 차이를 가지고 두 기질과 반응물과의 결합 정도가 달라져 radical 제거 능력의 차이가 있다(Li 등, 2007). ABTS radical 소거능을 측정한 결과 Fig. 2B에서와 같이 주름조개풀 water, ethanol 추출물 모두 150 μ g/mL phenolic의 농도에서 99, 95%의 radical 소거능을 나타내어 수용성 물질에 대한 항산화력 측정에서 높은 활성을 나타내었다. 수용성 항산화제 중 대표적인 vitamin C의 항산화활성 작용 메커니즘 중 하나는 지질과산화물을 매우 효과적으로 막아주는 vitamin E의 산화된 형태를 재생시켜 주는 기능을 가지고 있다. 식물이나 대부분의 동물은 당으로부터 vitamin C를 합성하지만 사람은 이를 합성할 수 없기 때문에 음식을 통하여 흡수해야 한다(Kwak 2008). 주름조개풀 추출물의 PF를 측정한 결과 Fig. 2C에서와 같이 water 추출물의 경우 1.26-1.51 PF를 나타내었고, ethanol 추출물은 1.26-2.08 PF의 항산화능을 나타내었다. 주름조개풀 추출물로 지용성 항산화능을 나타내는 TBARs를 측정한 결과 Fig. 2D에서와 같이 water, ethanol 추출물 모두 50 μ g/mL phenolic의 저농도에서 84, 99%로 나타내어 α -토코페롤과 β -카로틴과 같이 지용성 물질에 대한 항산화력 측정에서 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로 보아 주름조개풀 추출물은 수용성, 지용성 항산화에 대한 우수한 효능을 나타내었고, 추출물의 phenolic 화합물 농도에 따라 농도의존적으로 증가하는 양상을 나타내는 것으로 확인하였다. 또한 천연 항산화제 개발에 대한 신소재로도 활용 가능할 것으로 판단되었다.

주름조개풀 추출물의 α -Glucosidase, α -amylase 저해효과

α -Glucosidase는 소장 용모막에 존재하며 이당류나 다당류들을 보다 작은 단당류로 분해하여 당의 흡수를 촉진시켜 혈당 상승 작용을 일으킨다. 특히 식후 30분이 경과 시 당의 흡수가 촉진되어 혈당이 증가하는데, 당뇨병 환자의 경우 급격히 상승하는 과도한 혈당 및 고혈당증이 지속됨에 따라 발생하는 활성산소들로 인해 당뇨병의 복합증세인 신경장애, 신장장애, 그리고 망막증 등과 같은 질병이 발생하게 된다(McDougall과 Stewart 2005). 주름조개풀 추출물의 효모기원 α -Glucosidase 활성저해 효과를 측정한 결과 Fig. 3A에서와 같이 water 추출물에서는 저해효과가 나타나지 않았으며, ethanol 추출물에서만 11-44%로 첨가되는 phenolic 화합물의 농도에 따라 저해효과를 나타내었다. Cho 등(2008)은 진달래꽃 추출물이 200 μ g/mL의 농도의 물 추출물과 ethanol 추출물에서 62, 54%의 높은 α -Glucosidase 저해력을 보고한 것에 비해 주름조개풀 ethanol 추출물의 200 μ g/mL의 phenolic 농도에서 44%의 조금 낮은 저해력을 나타내었지만, 주름조개풀 추출물이 탄수화물 분해 효소의 활성을 저해하는 것으로 확인되었다. 탄수화물의 주종인 전분은 장관에서 α -amylase에 의해 그리고 소장의 maltase에 의해 glucose로 가수분해되어 결국 혈류로 흡수되어 혈당량 및 insulin level의 상승을 가져온다. 따라서 α -amylase와 같은 효소의 작용을 제한 조절 할 수 있을 경우 전분의 소화속도를 지연시킴으로써 그 흡수 kinetics 및 혈당량의 분포에 영향을 미치게 되어 탄수

Fig. 2 Antioxidant activity of water and ethanol extracts from *O. undulatifolius*. (A): DPPH, (B): ABTS, (C): PF, (D): TBARS. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

화물의 조절이상으로 기인한 당뇨병상이나 비만증상의 환자에게 있어서 식이요법의 치료효과를 증가시킬 수 있다(Brodbeck 1980). 주름조개풀 추출물의 α -amylase 활성저해 효과를 측정한 결과 Fig. 3B에서와 같이 water 추출물에서 37-88%로 저해효과가 상대적으로 높게 나타났으며, ethanol 추출물에서는 저해효과가 나타나지 않았다. Lee와 Lee(1994)는 phenolic 물질은 여러 식물체에 널리 분포되어 있지만 그들의 함량, 종류, 형태 등이 각각 다르므로, α -amylase 효소 활성의 저해는 polyphenol의 양과 종류에 따라 달라진다는 보고에 의하면 주름조개풀의 추출물에 용해되어 있는 phenolic 화합물 성분과 종류에 따라 ethanol 추출물에서는 억제력이 나타나지 않았지만 water 추출물에서 높은 억제력을 나타내었다. 따라서 주름조개풀 추출물의 당분해 억제 효과를 확인하였고 기능성 식품 분야에서 기능성 신소재로 적용 가능하다고 판단되었다.

주름조개풀 추출물의 tyrosinase 저해효과

Melanin은 피부의 표피 기저층에 존재하는 melanin 세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 합성되어 수상돌기를 통하여 피부 표피의 각질화세포로 이동하여 피부의 갈색과 검은색을 띠는 색을 나타낸다(Ortonne 2002). 외부 자극물질이나 자외선 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능도 있지만, 색소침착을 일으키는 과도한 생성은 피부에 기미, 주근깨와 검버섯을 형성하고 피부노화를 촉진하여 미용적인 면에서 부정적인 기능을 나

타내기도 한다(Ortonne 2002). 주름조개풀 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 4A에서와 같이 ethanol 추출물에서 47-82%의 저해활성을 나타내었으며, Jeong과 Oh(2014)는 마황 ethanol 추출물이 200 µg/mL 농도에서 38.8% 저해활성을 나타낸다고 보고한 것에 비해 주름조개풀의 tyrosinase 저해효과가 더 우수한 것으로 확인되었다.

주름조개풀 추출물의 elastase, collagenase 저해효과

피부조직의 탄력을 유지해주는 elastin의 결합을 분해하여 피부 주름 유발에 원인이 되는 elastase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 4B에서와 같이 water 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 4%의 비교적 낮은 저해활성을 나타내었고, ethanol 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 대조구인 EGCG (epigallocatechin-3-gallate)와 비슷한 저해활성인 61%의 저해활성을 나타내었다. Kim 등(2015)은 유산균 발효 배초향 ethanol 추출물이 0.3 mg/mL의 고농도에서 23%의 elastase 저해활성을 나타내었다고 보고한 것에 비해 주름조개풀 ethanol 추출물의 elastase 저해활성이 더 우수하다고 확인하였다. Collagen은 피부의 기계적 견고성과 결합조직의 저항력, 조직력, 세포분화와 분화를 유도하는 기능을 가지고 있으며, 자연노화에 따른 세포 활성 감소와 같은 내적요인과 여러 유해 환경에 의한 스트레스 증가, 자외선 조사에 의한 광노화와 같은 외적 요인에 의해 분해된다. 이러한 collagen의 감소는 피부의 탄력을 저하시켜 주름과 피부처짐

Fig. 3 Inhibition activity of water and ethanol extracts on α -glucosidase (A), and α -amylase disc method (B) from *O. undulatifolius*. Water extract has not shown activity on α -glucosidase and ethanol extract on α -amylase disc method. A: 50 µg/mL of phenolic content. B: 100 µg/mL of phenolic content. C: 150 µg/mL of phenolic content. D: 200 µg/mL of phenolic content. E: 0 µg/mL of phenolic content. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

의 원인이 된다고 보고되어 있다(Giacomoni과 Rein 2001). 주름조개풀 추출물 50-200 µg/mL phenolics 농도로 collagenase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 4C에서와 같이 water 추출물에서 3-39%의 저해활성을 나타내었고, ethanol 추출물에서는 20-67%의 저해활성을 나타내었다. Seo 등(2015)의 선복화 물 추출물의 collagenase 저해활성 측정결과, 마이크로웨이브 추출물과 가압 열수 추출물의 1.0 mg/mL 농도에서 각각 24, 25%의 저해활성을 나타내었다고 보고하여 주름조개풀 추출물의 저해활성이 더 우수한 것으로 확인되었고, 시중에 주름개선 화장료로 이용되고 있는 EGCG와 유사한 수준의 효능을 나타내는 것을 확인하였으며, 저해활성이 phenolic 농도에 따라 농도의존적으로 증가하였다.

주름조개풀 추출물의 astringent 효과

수렴작용이란 hemoglobin과 같은 피부 단백질이 추출물의 고분자 flavonoids 또는 phenolic contents와 같은 성분과 결합하는 성질을 가지기 때문에 가교결합하는 정도에 따라 피부가 수축되는 현상을 말한다. 따라서 수렴작용에는 외적 혹은 내적인 작용에 의해서 피부와 점막의 표면에 난용성 피막을 형성하는데, 이러한 작용은 구조를 보호하거나, 혹은 조직을 조밀하게 하여 세포막의 투과성을 감소시키는 효과가 있다. 그러므로 수렴성이 존재함은 피부를 수축시키므로 모공수축 효과가 있다고 말할 수 있다(Okuda 1986). 주름조개풀 추출물의 astringent 효과를 측정된 결과 Fig. 4D에서와 같이 water, ethanol 추출물 200 µg/mL 농도에서 각각 13, 32%의 효과를 나타내어 Kim 등(2011)이 호두 ethanol 추출물에서 55%의 수렴활성을 나타내었다고 보고한 바와 같이 주름조개풀 추출물의 astringent 효과를 확인하였고, 이러한 모공수축 효과를 활용한 기능성 화장품의 기초 원료로 활용될 것으로 판단되었다.

주름조개풀 추출물의 hyaluronidase(HAase) 저해효과

히아루론산(hyaluronic acid; HA)은 고분자 다당으로 진피중의 섬유아세포로부터 산출되고, 표피, 진피에 있어 주요한 extracellular matrix로서 존재하는 glucuronic acid와 glucosamine

이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide로서 이론상으로는 자신의 무게의 약 100배의 수분을 지탱하는 성질을 가지며 수분을 많이 포함하는 젤리상의 물질로 세포 간에 존재한다. 특히 염증 반응에 관여하여 상처 치유 및 조절에 중요한 역할을 하고 있다. 고분자 HA는 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하지만, HA 분해 산물 혹은 저분자 HA는 상처 치유 과정에서 fibrosis, collagen deposition, inflammation을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 류마티즘 관절염 등의 염증 환자에서 특히 높은 농도로 관찰되고 있다(Ghosh 1994; Lee 등, 2001). 주름조개풀 추출물의 HAase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 4E에서와 같이 ethanol 추출물 50-200 µg/mL phenolic 농도에서 12-46%의 HAase 저해효과를 나타내었으며, positive control로 사용한 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)보다는 낮은 억제효과를 나타내었지만, 주름조개풀 추출물의 항염증, 아토피 억제효과를 활용한 기능성 제품에 적용가능한 기초자료라고 판단되었다.

초 록

주름조개풀에 함유되어 있는 phenolic contents는 water, 70% ethanol을 용매로 하여 추출하였을 때 각각 7.7, 10.1 mg/g의 함량을 나타내었다. 추출물의 phenolic 농도를 50-200 µg/mL로 조절하여 항산화 효과를 측정된 결과, DPPH에서는 water, ethanol 추출물 50 µg/mL phenolics 농도에서 각각 78, 82%였고, ABTS radical decolorization은 100 µg/mL phenolics 농도에서 각각 92, 76%의 radical 소거능을 나타내었다. PF는 200 µg/mL phenolics 농도에서 water, ethanol 추출물에서 각각 1.51, 2.08 PF로 측정되었으며, TBARS값은 water, ethanol 추출물 50 µg/mL phenolics 농도에서 각각 84, 99%의 활성을 나타내었다. 기능성 식품 활성을 측정하는 α -Glucosidase 저해활성을 측정된 결과 ethanol 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 44%의 억제력을 나타내었고, α -amylase 저해활성은 water 추출물 50-200 µg/mL phenolics 농도에서 37-88%의 효소 억제력을 나타

Fig. 4 Inhibition activity of water and ethanol extracts on tyrosinase (A), elastase (B), collagenase (C), astringent (D), and hyaluronidase (E) from *O. undulatifolius*. Water extract has not shown activity on hyaluronidase. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by a Duncan's multiple range tests

내었다. 미용 식품 활성을 나타내는 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 ethanol 추출물에서 82%의 tyrosinase 저해효과를 나타내었다. 또한 elastase 저해활성을 측정한 결과 water, ethanol 추출물에서 각각 4, 61%로 나타내었고, collagenase 저해활성을 측정한 결과 water, ethanol 추출물 200 µg/mL phenolics 농도에서 각각 39, 67%로 ethanol 추출물에서 높은 억제력을 나타내어 우수한 저해효과를 확인하였다. Astringent 효과를 측정한 결과 water, ethanol 추출물 200 µg/mL phenolic 농도에서 각각 13, 32%의 astringent 효과를 나타내었다. Hyaluronidase 저해활성을 측정한 결과 ethanol 추출물 200 µg/mL phenolic 농도에서 46%의 Hyaluronidase 저해효과를 나타내었다.

Keywords 생리활성 · 주름조개 · 추출물 · 항산화

감사의 글 이 논문은 2015학년도 경북대학교 복원학술연구비에 의하여 연구되었음.

References

- Ahn SI (2005) Antioxidative and physiological activities of some phenolic compounds. Dissertation, National University of Hankyong
- An EJ (2015) Novel function of p190RhoGEF in Nox4-mediated ROS generation. Dissertation, University of Ewha Womans
- Andarwulan N, Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue

- cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). J Agric Food Chem 47: 1776–1780
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199–1200
- Brodbeck U (1980) Enzyme inhibitors. Verlag chemie, Weinheim
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Method Enzymol 52: 302–310
- Cho YJ, Ju IS, Chun SS, An BJ, Kim JH, Kim MU, Kwon OJ (2008) Screening of biological activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* Turcz. flowers. J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 276–281
- Davidson PM, Parish ME (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technol 43: 148–155
- Dorfman A, OTT ML (1948) A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. Journal of biological chemistry 172: 367–375
- Fellegrini N, Ke R, Yang M, RiceEvans 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
- Folin O, Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. J Biol Chem 12: 239–243
- Ghosh P (1994) The role of hyaluronic acid in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. Clin Exp Rheumatol 12: 75–82
- Giacomoni PU, Rein G (2001) Factors of skin ageing share common mechanism. Biogerontol 2: 219–229
- Jeon YS, Jo BS, Park HJ, Kang SA, Cho YJ (2012) Screening of Biological Activity of *Caragana sinica* Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 1211–1219
- Jeong MA, Oh SJ (2014) The Effects of *Ephedra sinica* Ethanol Extract on Inhibition of Tyrosinase Activity and Melanin Generation. Kor J Aesthet Cosmetol 12: 471–478
- Kim MK, Kim JS, Jo BS, Kim JH, Lee IC, Lee MS, Cho YJ (2011) Functional Properties of Walnut in Cosmetics. Journal of Life Science 21: 858–864
- Kim NY, Park DS, Lee HY (2015) Effect of Anti-Skin Wrinkle and Antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through Fermentation Process of the lactic acid. Korean J Medicinal Crop Sci 23: 37–42
- Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J (1993) Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Technol 47: 85–89
- KFSV (2009) Life characteristics of plant resources from Korea forest. Korea forest seed and variety center, Chungju
- 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
- Kwak IS (2008) Comparison of different assays for evaluating antioxidant activity of polyphenols and tea extracts. Dissertation, National University of Chonbuk
- Lee JH, Lee SR (1994) Some physiological activity of phenolic substances in plant foods. Korean J Food Sci Technol 26: 317–323
- Lee JT, Jeong YS, An BJ (2002) Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. Kor J Herbology 17: 51–60
- Lee NH, Lee SJ, Jung DS, Bu HJ, Yang HC, Riu KZ (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. Kor J Pharmacogn 32: 175–180
- Lee TB (1999) Illustrated flora of Korea. Hyangmunsa, Seoul
- Lee YS, Yoon HK, Kim NW (2010) The physiological activities of ripe fruit of *Poncirus trifoliata*. Kor J Food Preserv 17: 698–705
- Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS, Han CD (2007) Drying and antioxidant characteristics of the shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom in a conveyor-type far-infrared dryer. J Korean Soc Food Sci Nutr 36: 250–254
- McDougall GJ, Stewart D (2005) The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. Bio Factors 23: 189–195
- Ohmoto T, Ikuse M (1970) Triterpenoids of the gramineae. Phytochemistry 9: 2137–2148
- Okuda K (1986) Astringent function of plant ingredient. Fragrance J 6: 270–274
- Ortonne JP (2002) Photoprotective properties of skin melanin. BR J Dermatol 146: 7–10
- Posner BM, Saffel-shrier S, Dwyer J, Franz MM (2000) Position of the American dietetic association: nutrition, aging, and the continuum of health care. J Am Diet Assoc 100: 580–595
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26: 1231–1237
- Rhee KH, Youn HS, Baik SC, Lee WK, Cho MJ, Choi HJ, Maenh KY, Ko KW (1990) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korea. J Kor Soc Microbiol 25: 475–490
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad Biol Med 20: 933–956
- Seo SJ, Park EJ, Kim NW (2015) Anti-wrinkle and antioxidant activity of a water soluble extract from *Imulae flos*. J Invest Cosmetol 11: 107–114
- Tibbot BK, Skadsen RW (1996) Molecular cloning and characterization of a gibberellin-inducible, putative α -glucosidase gene from barley. Plant Molecular Biology 30: 229–241
- Vincent J, Hearing JR (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. Method Enzymol 142: 154–165
- Wunsch E, Heidrich HG (1963) Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. Hoppe-Seyler's Physiol chem 333: 149–151