

## 오디로부터 분리한 페놀성 물질의 항산화 효과

차원섭 · 신해룡 · 박준희 · 오상룡 · 이원영 · 천성숙<sup>1</sup> · 추재원<sup>2</sup> · 조영제<sup>†</sup>

상주대학교 식품공학과, <sup>1</sup>영남대학교 식품가공학과, <sup>2</sup>경상북도농업기술원 잠사곤충사업장

### Antioxidant Activity of Phenol Compounds from Mulberry Fruits

Woen-Seup Cha, Hae-Ryong Shin, Joon-Hee Park, Sang-Lyong Oh,

Won-Young Lee, Sung-Sook Chun<sup>1</sup>, Jae-Weon Choo<sup>2</sup> and Young-Je Cho<sup>†</sup>

Department of Food Engineering, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

<sup>2</sup>Sericulture & Entomology Experiment station, Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, Sangju 742-040 Korea

#### Abstract

For the purpose of developing natural antioxidant, the antioxidative activity of phenolics isolated from Korean Mulberry(*Morus*) fruits was determined. Optimum extracting condition for phenolics were 60%(v/v) ethanol. The content of rutin and isoquercetrin as flavonoids were 82.83 mg/100 g and 43.23 mg/100 g respectively. The 2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid radical decolorization and antioxidant protection factor (PF) were determined with extracts from Mulberry fruits. Results showed 98% inhibition on ABTs by 80% ethanol extract and 1.25 PF on antioxidant protection factor by 60% ethanol extract. Electron donation ability on DPPH was higher 60% ethanol extract than other ethanol extracts. Also, hydroxyl radical scavenging activity of extracts was higher 60% ethanol extract than other extracts.

**Key words :** mulberry fruits, phenol, antioxidant

## 서 론

오디는 한방에서는 상삼자로 불리며 강장제나 진정제로 사용된 예가 있고, 부종억제, 숙취제거, 소갈증제거, 대머리 예방 및 치료 등에 사용된 것으로 기록되어 있으나, 현대의 학에서는 오디의 혈당강화작용에 대한 보고가 있을 뿐이며 (1), 최근 뽕나무 부산물 중 뽕잎, 누에 및 상백피 등의 생리 활성에 대한 연구가 비교적 활발하게 진행된 반면 오디에 대한 체계적인 연구는 거의 전무한 상태이다.

항산화제는 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하며 인공합성품을 비롯하여 동식물체 내에서도 이러한 기능을 갖고 있는 물질이 많이 알려지고 있으며, 대부분 천연 항산화제들은 나무, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃 등의 식물체 대부분에 존재하며 이들은 주로 폴리페놀물질로 알려져 있다(2). 유지 또는 유지

함유 식품의 산패는 주로 공기중의 산소와 결합에 의해 일어나는데, 이를 방지하기 위해 수많은 합성 또는 천연 항산화 물질이 개발되어 왔으나, 실제로 많이 사용되고 있는 것은 합성 항산화제이다(3). 그러나 최근 합성 항산화제의 간비대, 간장중 microsomal enzyme activity의 증가, 체내 흡수 물질의 일부가 독성물 혹은 발암성 물질화 등(4-7) 유독성에 대한 많은 논의가 이루어지고 있으며, 이에 따라 천연으로부터 얻은 항산화제를 인공합성물에 대체하려는 시도가 많이 이루어지고 있다(8,9).

따라서 본 연구에서는 천연 무공해 식품인 오디를 천연항산화제의 소재로 이용하기 위하여 오디로부터 페놀성 물질을 분리하고 항산화 효과를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 재료는 경북 상주시 잠사연구소에서 배한 뽕나무로부터 6월 초에 채취한 오디를 사용하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail : yjcho@sangju.ac.kr, Phone : 82-54-530-5265, Fax : 82-54-530-5269

Buthylhydroxytoluene(BHT), thiobarbituric acid,  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS),  $\beta$ -carotene 등은 Sigma사(USA)의 특급시약을 사용하였으며, Folin-ciocalteu시약,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , trichloroacetic acid, HCl 등은 일제 특급시약을 사용하였다.

### Phenol성 물질의 추출

오디로부터 phenol성 물질의 추출은 시료 오디 20 g에 60% EtOH 200 mL를 가하여 균질기로 20,000 rpm에서 1분간 균질화 시킨 후 24시간 동안 교반 추출하고, Whatman No 1으로 여과한 후 시료로 사용하였다.

### Phenol 화합물 정량

Phenol 화합물의 정량은 Dural과 Shetty의 방법(10)에 준하여 측정하였다. 즉, 시료 용액 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 가하여 잘 흔들어 준 후, 1N Folin-ciocalteu 시약 0.5 mL를 가하여 발색시키고, 5분간 방치한 다음, 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mL를 가하여 60분 동안 실온에서 방치시켰다. 방치 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 95% ethanol에 녹인 gallic acid를 사용한 표준 곡선에서 양을 환산하였다.

### Phenol 성분 분석

상기의 phenol 추출법과 같이 동결 건조한 오디 시료 0.5 g을 60% EtOH 50 mL에 넣고 24시간 동안 교반, 추출하여 다음 분석에 이용하였다. HPLC는 TSR(CA, USA)의 분석용 liquid chromatography를 이용하였으며, Spectra system gradient pump, UV/VIS detector, SP 4600 integrator, Rheodyne injection valve(20  $\mu\text{L}$ )를 부착하여 사용하였다. Column은 Waters의  $\mu$  Bondapak  $\text{C}_{18}$  (3.9 $\times$ 300 mm)를 사용하였다. 이동상으로 2.5% AcOH:MeOH:Acetonitrile=70:10:20의 혼합 용매를 사용하였으며, 용매를 40분 동안 0.4 mL/min로 isocratic elution을 시켰다. UV detector의 파장은 350 nm, 감도는 0.05 AUFS로 하였으며, integrator의 chart speed는 0.25 mm/min으로 하였다.

### ABTS radical cation decolorization의 측정

ABTS의 측정은 Pellegrini 등의 방법(11)에 의해 측정하였다. 즉, 7 mM ABTS 5 mL와 140 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  88  $\mu\text{L}$ 를 섞은 용액 1 mL와 ethanol 88 mL를 혼합한 ABTS용액 1 mL와 시료용액 50  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 30초간 섞은 후 2.5분간 incubation 하고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 효과는 percentage inhibition(%)으로 나타내었다.

### Antioxidant Protection Factor(PF) 측정

PF는 Andarwulan과 Shetty의 방법(12)으로 측정하였다. 10

mg  $\beta$ -carotene/50 mL의 chloroform 용액 1 mL에 20  $\mu\text{L}$  linoleic acid, 184  $\mu\text{L}$  Tween 40 와 50 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 가하여 emulsion을 만들고, 5 mL의 emulsion에 시료용액 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 vortex로 잘 섞어준 뒤 50  $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 방치한 후 식혀주고, 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. PF는 sample O.D/control O.D로 나타내었다.

### 전자공여능 측정

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois의 방법(13)을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH 1.0 mL를 넣고 vortex로 섞어주고 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은  $100(\text{시료첨가구의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 으로 나타내었다.

### Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정

TBARS는 Buege와 Aust의 방법(14)에 따라 측정하였다. 1% linoleic acid와 1% Tween 40으로 emulsion을 만들고 emulsion 0.8 mL와 시료 0.2 mL를 섞은 후 35  $^\circ\text{C}$  water bath에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 반응액 1 mL에 TBA/TCA 시약 2 mL를 가하고 15분간 끓인 다음 10분간 냉각시키고 15분간 3000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상정액은 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. TBARS값은 1 mL 반응혼합물에 대해서 생성된 1,1,3,3-tetraethoxypropane(TEP)의  $\mu\text{g}$ 으로 표시하였다.

### Hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ) 소거 활성 측정

Hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ) 소거 활성 측정은 Gutteridge의 방법(15)에 의해 측정하였다. Oil emulsion 대신에 deoxyribose를 사용하여 1 mL 반응 혼합물을 채운 시험관을 37  $^\circ\text{C}$  water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 직후 2 mL TCA/TBA 시약을 가하고, 혼합하여 끓는 물에서 15분간 가열시킨 후 찬물에서 냉각시켜 2,000 $\times$ g의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상정액을 흡광도 531 nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 오디로부터 phenol성 물질의 추출에 미치는 용매의 영향

추출용매를 달리하여 오디로부터 phenol성 물질을 추출한 결과 Fig. 1에서와 같이 증류수로 추출한 것 보다 ethanol이나 acetone으로 추출한 실험구가 phenol의 용출량이 높았으며, 이는 오디의 phenol성분들이 극성용매에서 용해도가 높기 때문으로 판단되었다.

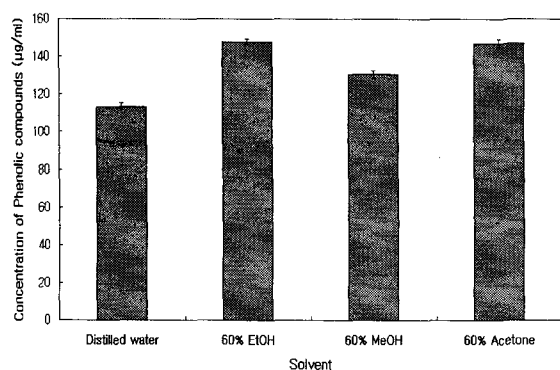


Fig. 1. Effect of solvent type on extraction of phenolic compounds from Mulberry fruits.

### 오디로부터 phenol성 물질의 추출에 미치는 ethanol 농도의 영향

다양한 농도의 ethanol을 추출용매로 하여 phenol성 물질을 추출한 결과 Fig. 2에서와 같이 60% ethanol 농도에서 추출량이 가장 높았으며 이는 cereal grain의 phenol성 물질이 60% ethanol에서 추출수율이 가장 높다는 Zeilinski와 Kozlowska (17)의 결과와 유사하였다.

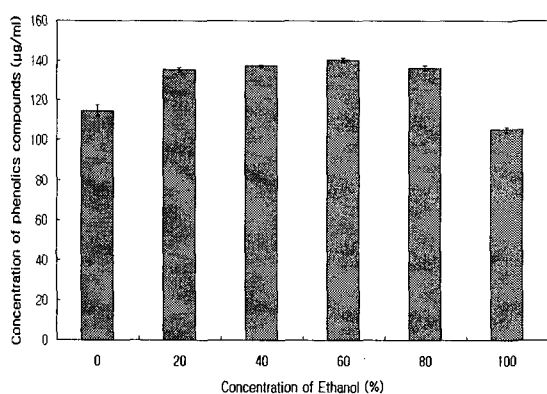


Fig. 2. Effect of phenolic compounds extraction by concentration of ethanol from Mulberry fruits.

### 오디의 phenol 성분 분석

오디에 함유되어 있는 phenol 성분을 분석한 결과 Table 1과 같이 rutin, isoquercitrin, quercitrin 등이 발견되었으며, 오디 중에는 모세혈관 강화작용과 모세혈관 수축작용에 영향을 미치는 성분으로 알려져 있으며, 순환계 질환 치료제 보조인자 등으로 사용되고 있는(16) rutin이 82.83 mg/100 g으로 가장 많이 함유되어 있었고, isoquercitrin 함량은 rutin 함량의 약 1/2정도가 검출되었다. 뽕잎중의 phenol성 물질의 함량은 isoquercitrin, rutin, quercitrin 순으로 isoquercitrin 함량이 가장 높으나, 오디 중에서는 뽕잎과는 달리 rutin 함량이

가장 높았다. 이같은 flavonoid계 화합물은 UV광선, 해충 및 미생물로부터 식물체의 보호, 항산화작용, 효소활성 조절작용 및 꽃 색깔의 결정성분으로 작용하는 등 식물체의 생존에 중요한 역할을 하는데, 이와 같이 오디의 rutin 함량이 높은 점은 기능성 식품 등으로 오디 이용의 다양화를 가능케 할 것으로 기대된다.

Table 1. Flavonol glycoside contents in Mulberry fruits

Flavonol glycoside	Content (mg/100g)
Rutin	82.83
Isoquercitrin	43.23
Quercitrin	10.15

### ABTS radical cation decolorization 측정

오디추출물의 친수성 및 lipophilic-물질의 항산화력을 측정하기 위하여 ABTS radical cation decolorization을 측정한 결과, Fig. 3과 같이 80% ethanol 추출군의 inhibition이 약 98%로 가장 높게 나타났으며 40%와 60% ethanol 추출군도 96% 이상의 inhibition을 나타내 친수성 및 lipophilic 물질에 대한 항산화력이 우수한 것으로 판단되었다.

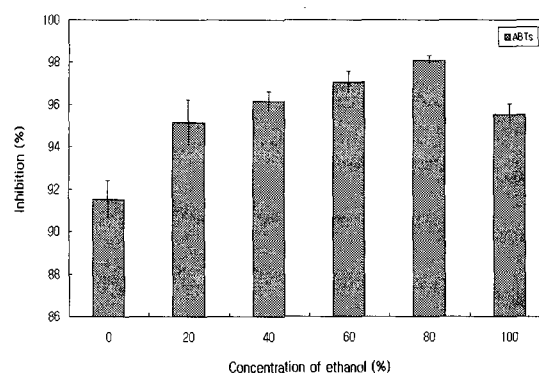


Fig. 3. Effect of ethanol extract on ABTS radical cation decolorization.

### Antioxidant Protection Factor(PF) 측정

PF의 측정을 위하여  $\beta$ -carotene을 첨가한 linoleic acid emulsion을 사용하여 오디 추출물의 항산화력을 측정한 결과 Fig. 4에서와 같이 60% ethanol 추출군이 PF 1.25정도의 antioxidant protection factor를 나타내 지용성물질에 대한 항산화력이 비교적 높은 것으로 확인되었다. Duval과 Shetty (10)는 pea에 함유되어있는 phenol성 물질의 PF가 1.1~1.3 정도였다고 보고하였으며, 본 실험의 오디의 PF 1.26과 유사한 antioxidant protection을 나타내었다.

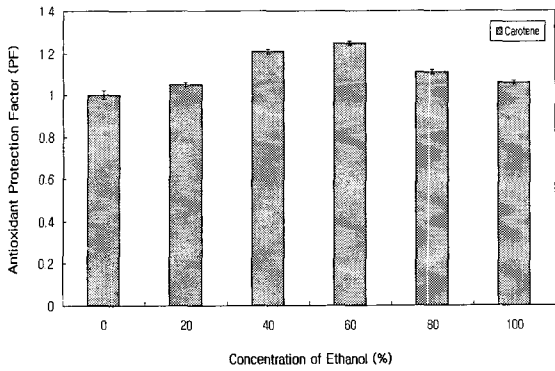


Fig. 4. Effect of ethanol extract from Mulberry fruits on antioxidant protection factor.

전자공여능 측정

DPPH 라디칼에 대한 소거 활성은 Fig. 5와 같이 열수추출물 보다 ethanol추출물의 전자공여능이 우수하였으며, 60% ethanol 추출물이 약 81%로 가장 높은 값을 나타내었다. 또한 40%와 80%의 ethanol추출물은 각각 77.33%, 78.24%로 비교적 높은 수치를 나타내었다. 강 등(18)은 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenolic 성 물질에 대한 항산화작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것 일수록 전자공여능이 높다고 하였다. DPPH는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 전자공여능의 차이 측정이 가능하다. 따라서 항산화물질의 전자공여능을 측정할 때는 DPPH 법이 편리하다고 알려져 있으나, 색소가 함유된 추출물의 경우 DPPH법의 적용에는 많은 경향이 요구된다.

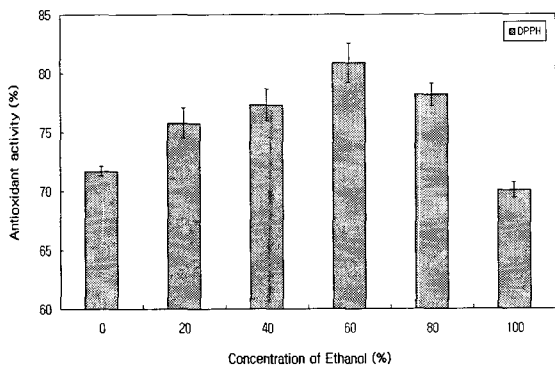


Fig. 5. Effect of ethanol extract from Mulberry fruits on electron donating ability.

TBARS 측정

오디 추출물들의 thiobarbituric acid reactive substance를 측

정한 결과 Fig. 6 에 나타난 바와 같이 각 농도의 ethanol 추출물 모두 대조구의 2.26  $\mu\text{M}$ 에 비하여 낮은 TBARS값을 나타내었다. 그 중에서도 80% ethanol 추출물이 1.81  $\mu\text{M}$ 로 가장 낮은 TBARS값을 나타내어 산화촉진인자를 binding하는 능력이 가장 높게 나타났다. 열수 추출물과 ethanol 추출물 간의 지방산화정도의 크지 않았지만, 김 등(19)이 유기용매에 의한 대두추출물의 항산화 실험에서 전반적으로 열수추출물에 비해 유기용매 추출물의 항산화 효과가 우수하였으나, 난황레시틴 리포좀의 과산화 억제 정도는 열수 추출물이 우수하다고 보고한 결과와 부분적으로는 일치하나 용매별 추출물의 지방산화정도는 시료조제 및 추출방법에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다.

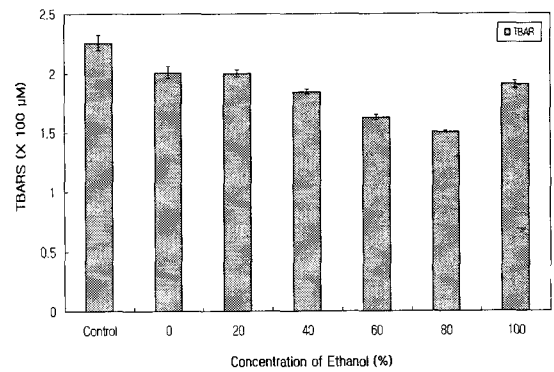


Fig. 6. Effect of ethanol extract from Mulberry fruits on TBARS of antioxidation.

Hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ) 소거활성 측정

Hydroxyl radical에 대한 각 추출물들의 소거활성을 검토하기 위하여 deoxyribose상에서 실험한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 대조구의 1.23  $\mu\text{M}$ 에 비하여 대부분의 ethanol추출물들이 낮은 TBARS 값을 나타내어  $\cdot\text{OH}$  포집능력이 좋은 것으로 판단되었다.

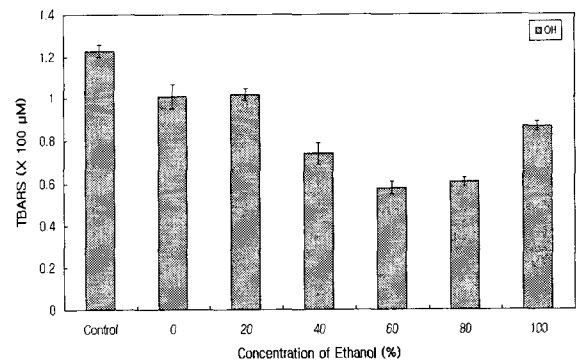


Fig. 7. Effect of ethanol extracts from Mulberry fruits hydroxy radical scavenging ability.

## 요 약

뽕나무 열매(오디)를 이용하여 천연항산화제를 개발할 목적으로 오디로부터 페놀성 물질을 추출하여 항산화 활성을 측정하였다. 페놀성 물질의 추출은 60% ethanol을 사용하여 추출하는 것이 수율이 가장 좋았으며, rutin과 isoquercetrin의 함량이 높았다. 추출된 오디 추출물의 ABTS radical decolorization과 antioxidant protection factor(PF)를 살펴 본 결과 ABTS는 80% 추출물이 약 98%의 억제율로 최고의 저해율을 나타내었고, PF는 60% 추출물에서 1.25로 가장 높은 protection factor를 나타내었다. DPPH에 대한 전자공여능은 60% 에탄올 추출물이 물 추출물이나 다른 농도의 ethanol추출물의 전자공여능 보다 우수하였다. 활성산소 중 지방산화를 일으키는데 주요한 역할을 하는 hydroxyl radical에 대한 각 추출물들의 영향은 60% 에탄올 추출물이 다른 추출물에 비하여 낮은 TBARS 값을 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 오디로부터 추출한 페놀성 물질은 천연 항산화 물질로 활용할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 참고문헌

- Kim, H. B., Lee, Y. W., Lee, W. J. and Moon, J. Y. (2001) Physiological effects and sensory characteristics of Mulberry fruit wine with chongilppong. Korean J. Seric. Sci. 43, 16-20
- Pratt, D. E. (1992) Natural antioxidants from plant materials: In Phenolic compounds in food and their effects on health (II). Huang, M. T., Ho, S. T. and Lee, C. Y.(eds.). Am. Chem. Soc., Washington D.C. p.54-60.
- Haumann, B. F. (1990) Antioxidants; Firms seeking products they can label as 'natural'. Inform, 1, p.1002-1005
- Farag, R. S., Badei, A. Z. M. A. and Baroty, G. S. A. (1989) Influence of thyme and clove essential oils in cotton seed oil oxidation. JAOCS, 66, 800-805
- Baranen, A. L. (1975) Toxicological and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. JAOCS, 52, 59-63
- Farag, R. S., Ali, M. N. and Taka, H. S. (1990) Use of some essential oils as natural preservatives for butter. JAOCS, 68, 188-192
- Osawa, T. and Namiki, M. (1981) A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem., 45, 735-743
- Andarwulan, N., Fariaz, D., Wattimena, G. A. and Shetty, K. (1999) Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. J. Agric. Food Chem., 47, 3158-3163
- Larson, R. A. (1988) The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27, 969-974
- Dural, B. and Shetty, K. (2001) The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea (*Pisum sativum*) elicited by genetically transformed anise root extract. J. Food Biochem., 25, 361-377
- Pellegrin, N., Roberta, R. Min, Y. and Catherine, R. E. (1998) 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 in Enzymology, 299, 379-389
- Andarwulan, N and 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, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200
- Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. Method in Enzymology, 105, 302-310
- Gutteridge, J. M. C. (1984) Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxysugars. nucleoxides-and benzoate. J. Biochem., 224, 761-767
- Markham K. R. (1989) Flavones, Flavonols and their glycosides. Methods in plant biochemistry, 1, 197-235
- Zielinski, H. and Kozłowska, H. (2000) Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. J. Agric. Food Chem., 48, 2008-2016
- Kang, Y. H., Park, Y. K., Oh, S. R. and Moon, K. D. (1995) Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort Extracts. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 978-984
- Kim, J. Y., Maeng, Y. S. and Lee, K. Y. (1995) Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. Korean J. Food Sci. Technol., 27, 635-639

(접수 2004년 8월 26일, 채택 2004년 9월 17일)